



# UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y  
TECNOLÓGICAS

POSGRADO EN BIOCENCIAS

---

**USO DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA  
SINTETIZADAS CON EXTRACTOS DE *Rumex  
hymenosepalus* COMO ESTRATEGIA PARA  
COMBATIR LA ENFERMEDAD DE LA NECROSIS  
HEPATOPANCREÁTICA AGUDA (AHPND) EN  
POSTLARVAS DE CAMARÓN.**

**TESIS**

que para obtener el grado de:

**MAESTRO EN BIOCENCIAS**

presenta:

**FRANCISCO JAVIER ALVAREZ CIREROL**

Hermosillo, Sonora, México

Diciembre de 2017

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

## **DERECHOS DE AUTOR**

El presente trabajo de tesis se presenta como uno de los requisitos parciales para la obtención del grado de **Maestro en Biociencias** de la Universidad de Sonora.

Se deposita en la biblioteca de Ciencias Biológicas y de la Salud para ponerla a disposición de los interesados. Se permiten citas breves del material contenido en la tesis sin permiso del autor, siempre y cuando se otorgue el crédito correspondiente. Para reproducir, o en su caso referirse a este documento en forma parcial o total, se deberá solicitar la autorización al Coordinador del Programa del Posgrado.

Bajo cualquier otra circunstancia se debe solicitar permiso directamente al autor.

Atentamente

---

**Francisco Javier Álvarez Cirerol**

Autor

---

**Dra. Nohemí Gámez Meza**

Coordinadora del Programa de Maestría en Biociencias

USO DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA SINTETIZADAS CON EXTRACTOS DE  
*Rumex hymenosepalus* COMO ESTRATEGIA PARA COMBATIR LA ENFERMEDAD  
DE LA NECROSIS HEPATOPANCREÁTICA AGUDA (AHPND) EN POSTLARVAS  
DE CAMARÓN.

T E S I S

que para obtener el grado:

MAESTRO EN BIOCIENCIAS

presenta:

FRANCISCO JAVIER ALVAREZ CIREROL

Hermosillo, Sonora, México.

Diciembre del 2017

## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis intitulada “Uso de nanopartículas de plata sintetizadas con extractos de *Rumex hymenosepalus* como estrategia para combatir la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND) en postlarvas de camarón” presentada por Francisco Javier Alvarez Cirerol, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Biociencias.



Dr. Marco Antonio López Torres  
Codirector y Presidente



Dr. Ramón Alfonso Íñiguez Palomares  
Codirector



Dr. Enrique De la Re Vega  
Sinodal secretario



Dra. Ericka Rodríguez León  
Sinodal interno



Dr. Marcel Martínez Porchas  
Sinodal Externo

## **DEDICATORIA**

A Dios, aun y cuando tengo la impresión de que tu no intervienes al menos que sea muy necesario, agradezco por que lo aleatorio tomará forma y valor para mí.

A mi madre Sandra Cirerol que me ha apoyado desde mi interés en la ciencia, he aprendido de ella paciencia, perseverancia y si soy una buena persona, ha sido por Ella.

A mi padre Francisco Alvarez, quien siempre fue para mi un ejemplo de cumplir los compromisos, ser correcto, de siempre darlo todo en cualquier proyecto se embarque. Gracias por en los momentos más difíciles, tu solo recuerdo lo hacía soportable y ameno para mí. Espero me observes desde donde te encuentras.

A mis hermanos Gibran, Giselle y Tanya que de una u otra manera soportan a su hermano en el desarrollo de este trabajo.

A Alesy Cordova, quien me motivaba a seguir adelante, siempre brindándome apoyo y confiando en que sería capaz de realizar este trabajo.

A demás familiares, amigos que siempre se preocuparon por mis avances y gracias a ellos, soy quien soy hoy en día.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a la Universidad de Sonora (UNISON) por brindarme instalaciones, maestros, administrativos para seguir mi formación académica y humana.

Al Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (DICTUS) y en especial al Posgrado en Biociencias por permitirme seguir mi carrera, ahora hacia un nivel posgrado n mayor, siempre disfrutando con todo su personal.

Al Dr. Ramón Íñiguez por brindarme apoyo, guía y tenerme paciencia durante todo el trabajo, gracias por siempre tener buena disposición, transformarse en alguien con quien siempre podía contar y seguirme formando como investigador.

Al Dr. Marco Antonio López Torres quien siempre me brindo consejo, guía con una sonrisa, por su paciencia, comprensión, siempre contar con su mano para apoyarme cuando hizo falta y por ayudarme a volverme más profesional.

Al comité de tesis Dra. Ericka Rodríguez, Dr. Enrique De la Re y Dr. Marcel Martínez por sus consejos, disposición y apoyarme en todo el desarrollo del trabajo.

Al equipo de laboratorio de Biomateriales por las risas, desveladas, apoyarme y acompañarme a la culminación del proyecto.

A University of Textas at San Antonio (UTSA), en especial al Department of Physics & Astronomy por brindarme el equipo, entrenamiento y por todas las personas que me ayudaron a enriquecer el trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por apoyarme con la beca de manutención durante mi maestría con el CVU 712583.

## RESUMEN

El Síndrome de Mortalidad Temprana (EMS) o Síndrome de Necrosis Hepatopancreática Aguda (AHPNS) ha provocado bajas en la producción de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) a nivel mundial. La enfermedad es producida por una bacteria del género *Vibrio*, (*Vibrio parahaemolyticus*) por lo que, como una alternativa al uso de antibióticos para su control, se plantea el uso de nanopartículas de plata (NpAg) sintetizadas con extracto de *Rumex hymenosepalus*. Se evaluó la capacidad antimicrobiana de distintas concentraciones de NpAg y extracto puro de *Rumex* sobre la bacteria *V. parahaemolyticus*. Se eligió la concentración de 25µg/ml NpAg y de 220µg/ml para el extracto como las más efectivas, se probó su toxicidad sobre nauplios de *Artemia franciscana* y los cuales se usaron como vector de NpAg y extracto hacia postlarvas de *L. vannamei* en retos con la bacteria. Los resultados mostraron mayor sobrevivencia de los camarones tratados que el grupo control. Se tomaron muestras de postlarvas del bioensayo y se fijaron con gluteraldehído para su estudio por microscopia electrónica de transmisión (MET) en busca de nanopartículas en el área del hepatopáncreas.



## ABSTRACT

Early Mortality Syndrome (EMS) or Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome (AHPNS) has caused declines in worldwide production of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). The disease is produced by a bacteria of the genus *Vibrio*, (*Vibrio parahaemolyticus*) so, we propose the use of silver nanoparticles (AgNps) synthesized with extract of *Rumex hymenosepalus* as an alternative to the use of antibiotics for their control. This study evaluated the antimicrobial capacity of concentrations of AgNps and pure extract of *Rumex* on the bacteria *V. parahaemolyticus*. The concentration of 25 µg / ml of AgNps and 220µg/ml for extract were chosen as the most effective, tested its toxicity on nauplii of *Artemia franciscana* and was subsequently used as vector of NpAg to postlarvae of *L. vannamei* in challenges with the bacteria. The results showed higher survival of the treated shrimp than the control group. Post-larval samples were taken from the bioassay and fixed with gluteraldehyde for its study by transmission electron microscopy (TEM) in order to search nanoparticles in the hepatopancretic area.

## ÍNDICE GENERAL

	Página
APROBACIÓN .....	i
DEDICATORIA .....	ii
AGRADECIMIENTOS .....	iii
RESUMEN .....	iv
ABSTRACT .....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ÍNDICE DE TABLAS .....	xi
INTRODUCCIÓN .....	1
I. ANTECEDENTES .....	3
I.1. <i>Litopenaeus vannamei</i> y su cultivo .....	3
I.2. <i>Artemia franciscana</i> .....	4
I.3. Enfermedades en el camarón .....	5
I.3.1. <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .....	7
I.3.2. Uso de antibióticos .....	8
I.4. Síntesis verde de nanopartículas .....	11
I.4.1. Fitosíntesis .....	12
I.4.2. Nanopartículas y sus efectos microbicidas .....	14
I.4.3. Nanopartículas en organismos marinos .....	16
I.5. Genero <i>Rumex</i> .....	17
I.5.1. <i>Rumex hymenosepalus</i> .....	17
II. JUSTIFICACIÓN .....	19
III. HIPÓTESIS .....	20
IV. OBJETIVOS .....	21
IV.1. Objetivo general .....	21
IV.2. Objetivos específicos .....	21
V. METODOLOGÍA .....	22
V.1. Obtención de extracto .....	22
V.2. Síntesis de nanopartículas de plata empleando extractos de <i>Rumex hymenosepalus</i> .....	23
V.3. Caracterización del extracto y nanopartículas de plata (AgNps) por UV-Vis .....	23
V.4. Espectroscopía infrarroja (IR) del extracto y AgNPs .....	24
V.5. Caracterización de las AgNPs por Microscopía Electrónica de Transmisión .....	24
V.6. Obtención de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de AgNPs y del extracto de <i>R. hymenosepalus</i> .....	25

	<b>Página</b>
V.7. Nauplios de <i>Artemia franciscana</i> y prueba de toxicidad .....	26
V.8. Reto bacteriano experimental con postlarvas de camarón blanco, <i>L. vannamei</i> .....	27
V.8.1. Reto bacteriano preventivo en postlarvas de camarón .....	27
V.8.2. Reto bacteriano correctivo en postlarvas de camarón .....	29
V.9. Preparación de muestra para MET y MEB .....	30
V.10. Corte y montaje de muestra para MET.....	32
V.11. Observación por microscopio electrónico de transmisión (MET) y microscopio electrónico de barrido (MEB) .....	32
V.12. Análisis estadístico .....	33
VI. RESULTADOS .....	34
VI.1. Extracto de <i>Rumex hymenosepalus</i> .....	34
VI.1.1. Espectro UV-VIS el extracto .....	34
VI.1.2. Espectro IR del extracto y AgNPs sintetizadas .....	34
VI.2. Nanopartículas sintetizadas .....	35
VI.2.1. Nanopartículas resultantes de síntesis .....	35
VI.2.2. Caracterización de nanopartículas de plata por espectroscopia UV-Vis .....	36
VI.2.3. Caracterización de AgNps por microscopía electrónica de transmisión y de barrido .....	37
VI.3. Inhibición bacteriana por AgNPs y extracto de <i>R. hymenosepalus</i> .....	40
VI.3.1. Análisis de <i>V. parahaemolyticus</i> bajo MET y MEB .....	41
VI.4. Prueba de supervivencia de nauplios de <i>Artemia franciscana</i> .....	42
VI.5. Retos bacterianos experimentales con postlarvas de camarón .....	44
VI.5.1. Reto bacteriano preventivo en postlarvas de camarón .....	44
VI.5.2. Reto bacteriano correctivo en postlarvas de camarón .....	45
VI.5.3. Observación de muestras de camarón MET, MEB y espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDS) .....	47
VII. DISCUSIÓN .....	49
VII.1. Extracto .....	49
VII.2. Espectroscopía IR de Extracto de <i>Rumex hymenosepalus</i> y AgNPs .....	49
VII.3. Síntesis de nanopartículas .....	52
VII.4. Inhibición bacteriana .....	53
VII.5. Toxicidad sobre nauplios de <i>Artemia franciscana</i> .....	53
VII.6. Retos bacterianos experimentales con postlarvas de camarón .....	54
VII.6.1. Retos bacterianos preventivo y correctivo en postlarvas de camarón .....	54

	<b>Página</b>
VII.6.2. Observación de muestras de camarón MET, MEB y espectrometría de dispersión de energía de rayos X .....	55
VIII. CONCLUSIONES .....	57
VIII.1. Extracto .....	57
VIII.2. Síntesis de nanopartículas .....	57
VIII.3. Inhibición bacteriana .....	57
VIII.4. Toxicidad y acarreamiento <i>Artemia franciscana</i> .....	57
VIII.5. Evaluar los efectos inhibitorios de las nanopartículas de plata y <i>Rumex hymenosepalus</i> sobre camarones infectados con <i>V. parahaemolyticus</i> .....	58
IX. RECOMENDACIONES .....	59
X. LITERATURA CITADA .....	60
ANEXO 1	

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Ciclo de vida de camarón .....	3
2	<i>Artemia</i> utilizada como vector para llevar compuestos de interés a especies marinas que lo depredan .....	5
3	Comportamiento histórico de la producción de camarón .....	6
4	Comparación estructural entre la proteína Cry de <i>B. thuringiensis</i> y las proteínas PirA y PirB de <i>V. parahaemolyticus</i> .....	8
5	Mecanismo de reacción oxido-reducción que da lugar a la formación de plata metálica Ag <sup>0</sup> .....	12
6	Estructura tridimensional del t-resveratrol sin oxidar y oxidado .....	13
7	Esquema de la estabilización de nanopartícula de plata por moléculas oxidadas y sin oxidar de EGCG y t-resveratrol .....	14
8	Detalles botánicos de <i>Rumex hymenosepalus</i> .....	18
9	Cortes de raíz de <i>Rumex hymenosepalus</i> presentando las tonalidades rojizas interna y café externo características .....	22
10	Incubadora SYNERGYHTX para la evaluación de la Concentración Mínima Inhibitoria de las nanopartículas de plata y del extracto de <i>Rumex</i> .....	25
11	Sistema experimental para las pruebas de toxicidad con nauplios de <i>Artemia</i> .....	26
12	Espécimen de Postlarva 20 de camarón blanco, <i>Litopenaeus vannamei</i> , utilizada en el reto bacteriano observada por estereoscopio.	28
13	Sistema experimental de camarones .....	29
14	Corte y toma de muestra de camarón .....	30
15	Serie de lavados .....	31
16	Rejillas secándose para ser observadas en MEB .....	31
17	Muestra sólida teñida y Ultramicrotomo .....	32
18	Equipo METJEOL 1230 y MEB HITACHI 5500 .....	33
19	Espectros UV-Visible de los extractos de <i>R. hymenosepalus</i> , comercial y fresca obtenidos con una mezcla de solventes etanol/agua (70/30) .....	34
20	Espectro IR del extracto de <i>R. hymenosepalus</i> y de las AgNPs sintetizadas y sometidas a proceso de limpieza .....	35
21	Coloración de la solución con nanopartículas posterior a la síntesis ...	36
22	Espectro UV-Visible de las AgNPs obtenidas de la síntesis con extractos de <i>R. hymenosepalus</i> .....	36

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
23	Micrografías de MET de la AgNPs sintetizadas a distintas amplificaciones .....	37
24	Micrografía MET de nanopartículas de plata y su correspondiente patrón de difracción electrónica de área selecta .....	38
25	MET de alta resolución de un conjunto de nanopartículas de plata y de una partícula de plata individual .....	39
26	Nanopartículas de plata envueltas en el extracto de <i>R. hymenosepalus</i> observado por MEB .....	39
27	Comportamiento de la cepa de la bacteria <i>V. parahaemolyticus</i> de prueba ante diferentes concentraciones de AgNPs con extracto de <i>R. hymenosepalus</i> .....	40
28	Comportamiento de la cepa de la bacteria <i>V. parahaemolyticus</i> de prueba ante diferentes concentraciones del extracto de <i>R. hymenosepalus</i> .....	41
29	Cepas de la bacteria de <i>V. parahaemolyticus</i> tratadas con AgNPs sintetizadas con extracto de <i>R. hymenosepalus</i> observadas en campo oscuro.....	42
30	Nauplios de <i>Artemia</i> donde se observa el material de prueba en su región intestinal .....	43
31	Nauplios de <i>Artemia</i> tratados observados bajo microscopía confocal en campo oscuro .....	43
32	Supervivencia de postlarvas de camarón con tratamientos de AgNPs y extracto de <i>Rumex</i> y control sin infectar, durante 24 horas .....	45
33	Supervivencia de postlarvas de camarón después 24 horas de infección con la bacteria <i>V. parahaemolyticus</i> con tratamientos previos de AgNPs, extracto de <i>Rumex</i> y control .....	45
34	Supervivencia de postlarvas de camarón sin infección de <i>V. parahaemolyticus</i> con AgNps, extracto de <i>Rumex</i> y control .....	46
35	Supervivencia de camarón infectado con <i>V. parahaemolyticus</i> con AgNps, extracto de <i>Rumex</i> y control .....	47
36	Corte de hepatopáncreas de camarón con nanopartículas e infectado con <i>V. parahaemolyticus</i> observado bajo microscopía electrónica de barrido y aplicando EDS .....	48
37	Estructura química de los tres principales compuestos fenólicos en el extracto de la parte aérea de <i>R. dentatus</i> .....	50
38	Compuestos polifenólicos más abundantes en el extracto de <i>R. hymenosepalus</i> : epigallocatequina galato (EGCG), epicatequina galato (ECG), epicatequina (EC) y t- resveratrol glicosado .....	51

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
39	Comparación IR de <i>R. hymenosepalus</i> y <i>R. dentatus</i> .....	52
40	<i>Artemia</i> con intestino lleno y tasa de mortalidad en base a concentración de nanopartículas .....	54
41	Corte ultrafino (80nm) de intestino de camarón tratado con AgNps visto bajo MEB con puntos brillantes o blancos que pueden dar falsos positivos de AgNps .....	56

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>		<b>Página</b>
1	Producción total de camarón en las principales entidades .....	6
2	Antimicrobianos usados en la acuicultura y su importancia en la medicina humana .....	9
3	Mecanismo de acción de nanopartículas de plata contra diferentes microorganismos .....	15
4	Resultados Supervivencia de Artemia en presencia de AgNps y extracto de <i>Rumex</i> .....	44



## INTRODUCCIÓN

Si se considera que el 70% de nuestro planeta está cubierto de agua, es difícil sostener que la mayoría de nuestro requerimiento de nutrientes de origen animal pueda satisfacerse a partir de animales terrestres. México es un país con diversos ambientes y con una biodiversidad marina importante en un litoral costero de 11,543 km (Martínez *et al.*, 2009).

A pesar de la enorme superficie de agua, la pesca de captura ha llegado a su límite de producción; es por ello que la acuicultura se ha convertido en una alternativa real para el suplemento de proteína de origen animal.

En el 2014 se obtuvieron 73.8 millones de toneladas de producción acuícola, correspondiendo 49.8 millones a peces en escama, 16.1 millones de toneladas a moluscos y 6.9 millones de toneladas a crustáceos. Aun cuando la producción de crustáceos no es ni la décima parte de la producida en escama, generó 36.200 millones de dólares, siendo casi una tercera parte de lo generado por los peces de escama con 99.200 millones de dólares (La y Land, 2016).

La producción de camarón por acuicultura en México está situada en cuarto lugar por peso de producción; sin embargo, por su valor monetario ocupa el primer lugar, según el informe de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés) del 2016. De acuerdo al Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca del 2013, históricamente la producción de camarón por acuicultura tuvo una baja considerable, pasando de 130 mil toneladas en el 2009 a cerca de 100 mil toneladas en el 2012, mientras que para el 2013, se reportaron alrededor de 60 mil toneladas en el país (CONAPESCA, 2013).

En Sonora, la producción de camarón siguió la misma tendencia nacional durante ese período, manteniendo el liderazgo de producción de camarón en México, junto a Sinaloa (COSAES, 2013).

La baja producción de camarón se ha asociado primordialmente con enfermedades (Varela, 2017). Diversas estrategias se han planteado para combatir estas enfermedades predominando el uso de antibióticos, los cuales por su mal uso han generado situaciones que han comprometido la práctica acuícola (Smith *et al.*, 1994). Como propuesta emergente ha

surgido la implementación de la nanotecnología como una alternativa en el control de microorganismos patógenos, tanto en humanos como en animales (terrestres y marinos), con un especial énfasis en el uso de las nanopartículas de plata debido a su efecto microbicida de amplio espectro (Shaverdi *et al.*, 2007).

La nanotecnología, se encarga de estudiar la materia a tamaños nanométricos y se usa principalmente en la industria textil, alimentaria, electrónica (García *et al.*, 2011; Whitesides, 2005). Actualmente se estudia la manera de cómo desarrollar estos nanomateriales para que sean compatibles con sistemas biológicos y poder ser aplicados en biotecnologías como la acuicultura (Zhang, 2016). En el presente trabajo se utilizaron nanopartículas de plata sintetizadas con el extracto de raíz de una planta de la región llamada *Rumex hymenosepalus* para combatir la enfermedad de la Necrosis Aguda Hepatopancreática (ANHPD) generada por la bacteria *Vibrio parahaemolyticus* la cual produce la enfermedad principalmente en postlarvas de camarón; asimismo, evaluar la capacidad del propio nanomaterial matriz (*R. hymenosepalus*) como control de la enfermedad.

## I. ANTECEDENTES

### I.1. *Litopenaeus vannamei* y su cultivo.

El camarón blanco es una especie nativa del Océano Pacífico, particularmente de su costa oriental. Se distribuye desde Sonora, México hacia el centro y sur del continente americano: En estos lugares la temperatura se mantiene arriba de los 20°C durante todo el año; esta especie suele reproducirse en mar abierto y migrar en etapa de postlarva hacia las costas donde pasa a su etapa juvenil, adolescente y pre adulta. Habita en cuerpos de agua como manglares, estuarios y lagunas costeras.

Los machos suelen madurar a partir de los 20 g y las hembras a partir de 28 g que toma alrededor de seis meses y llega a su madurez sexual al tener un peso entre 30 y 45 g, donde la hembra libera miles de huevos para ser fertilizados (FAO, 2017). El ciclo de vida del camarón suele ser dividido en dos fases: la marina y la estuarina (Figura 1).

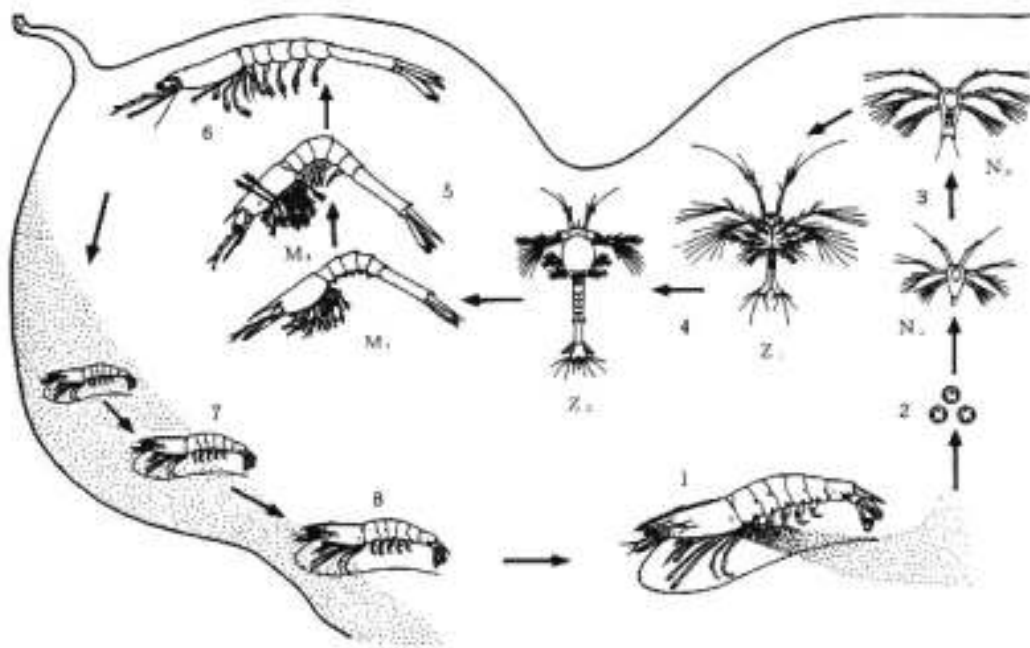


Figura 1. Ciclo de vida de camarón: Adulto (1), huevo (2), nauplio (3), zoea (4), mysis (5), postlarva (6), prejuvenil (7) y juvenil (8). (FAO, 2017).

La reproducción del camarón comienza cuando el macho deposita un paquete de esperma en la región del tético de la hembra el cual fertiliza los huevos a medida que son desovados; los huevos maduran y pasan a través de una serie de estadios larvales en los estuarios, que van de nauplio, zoea y mysis, para alcanzar después el estadio post-larva. En el estadio de post-larva el cuerpo del camarón es parecido al cuerpo que tendrá en su etapa adulta. Posterior a la post-larva viene el estadio juvenil, en el cual estará de 3 a 4 meses en el estuario para luego dirigirse al mar abierto donde empieza su crecimiento. La vida en promedio de un camarón es de 12 meses aproximadamente (Palma y Antonio, 2014; Morales, 1990; Ates *et al.*, 2016).

La alimentación del camarón cultivado consiste principalmente de fitoplancton en la etapa zoea y al arribar a la etapa de mysis y postlarva, en su alimentación predomina el uso de nauplios de *Artemia* y alimento microencapsulado (Página WEB FAO 2017).

## ***L2. Artemia franciscana***

La *Artemia* es un pequeño crustáceo usado comúnmente en la alimentación de organismos marinos, entre ellos el camarón, debido a su alto valor nutritivo y por su capacidad de incorporar diferente material particulado a su organismo con su alimentación. Esta propiedad permite utilizar a la *Artemia* como bioencapsulador. Este proceso es conocido como enriquecimiento de *Artemia* y puede ser utilizado para incorporar ácido grasos esenciales entre otros elementos, con lo que se puede mejorar la calidad de valor nutricional de *Artemia* para alimentar peces y crustáceos marinos, principalmente. También es muy útil su uso como vector de diferentes compuestos químicos para fines terapéuticos, dirigidos al control de microorganismos causantes de enfermedades (Thammasorn *et al.*, 2013) (Figura 2).

También es usado como bioindicador para determinar la toxicidad de metales pesados y otras sustancias tóxicas en ecosistemas naturales (Sorgeloos *et al.*, 1986).

La *Artemia*, al ser un organismo fácil de conseguir y desarrollar en laboratorio, últimamente se ha usado como modelo de organismos marinos para realizar experimentos de interacción con nanomateriales (Kumar *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017).

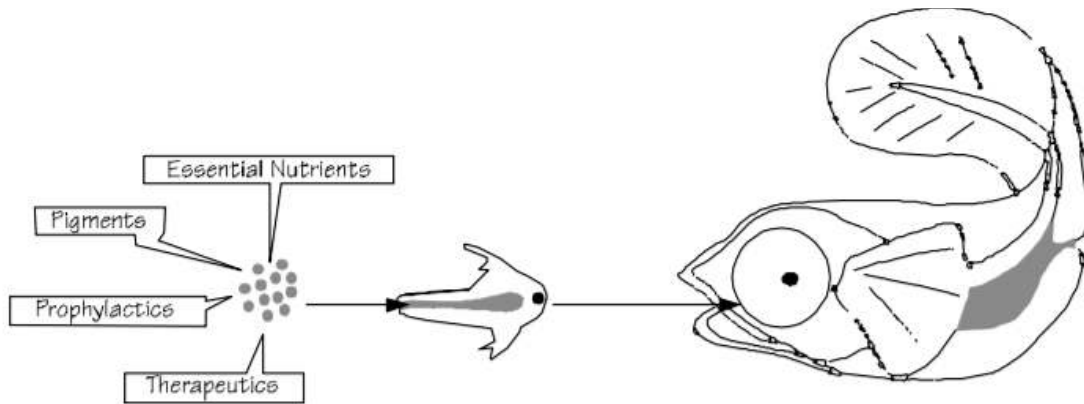


Figura 2. *Artemia* utilizada como vector para llevar compuestos de interés a especies marinas que lo depredan (Sorgeloos, 1986).

### I.3. Enfermedades en el camarón

Durante el 2010, China sufrió enormes pérdidas de producción en el sector acuícola por diversas causas: 1.2 millones de toneladas por desastres naturales; 123,000 toneladas por contaminación y, principalmente, pérdidas por enfermedades que llegaron a las 295,000 toneladas. Esto prácticamente acabó con la producción de cría de camarón marino en China (FAO, 2012).

El cultivo de camarón ha sido una importante fuente de divisas para México; sin embargo, en el año 2013 fue prácticamente devastada la industria camaronera debido a mortalidades generadas por diversas enfermedades, tales como el virus de la mancha blanca o por bacterias como *Vibrio parahaemolyticus*.

En la Figura 3 se pueden observar las variaciones en las producciones de camarón cultivado en México.

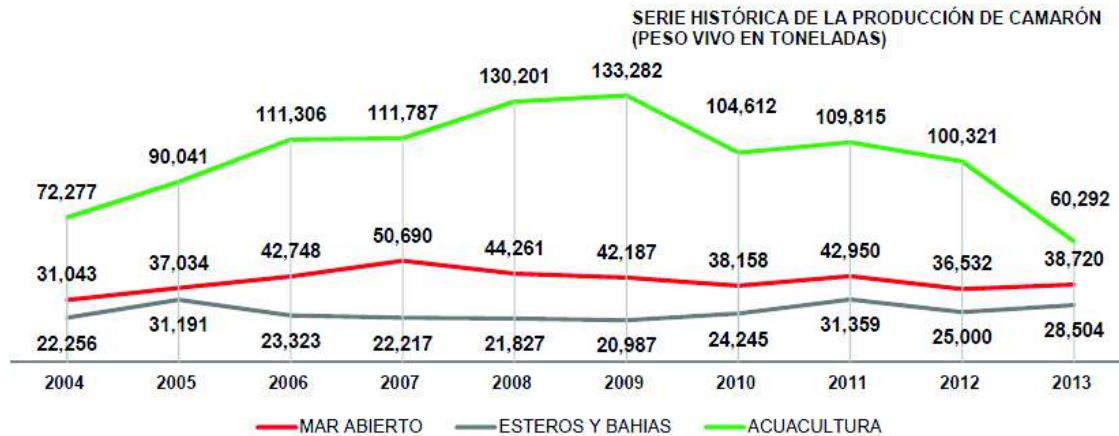


Figura 3. Comportamiento histórico de la producción de camarón (CONAPESCA, 2013).

En Sonora, en los últimos años la producción de camarón blanco, *Litopenaeus vannamei*, sufrió bajas importantes al igual que todo el país; por ejemplo, en el 2013 se produjo la mitad de lo que producía en el 2004 y una cuarta parte de lo que llegó a producir en el 2009. De las 127,517 toneladas reportadas en el 2013, 60,292 toneladas le corresponden a la acuicultura, la cual tuvo una reducción del 40.02 % con respecto del 2012 donde se obtuvieron 100,321 toneladas (CONAPESCA, 2013) (Tabla 1).

Tabla 1. Producción total de camarón en las principales entidades. (CONAPESCA, 2013).

TONELADAS  
2004-2013

ENTIDAD	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
<b>TOTAL</b>	<b>125,576</b>	<b>158,266</b>	<b>177,377</b>	<b>184,695</b>	<b>196,289</b>	<b>196,456</b>	<b>167,015</b>	<b>184,123</b>	<b>161,852</b>	<b>127,517</b>
SINALOA	32,727	45,764	60,076	66,255	60,441	55,838	59,498	79,020	63,870	61,002
SONORA	53,441	67,179	78,598	78,405	96,557	101,045	58,447	52,424	47,116	25,639
TAMAULIPAS	13,366	20,062	13,437	14,459	13,497	11,801	16,182	11,618	12,205	9,192
NAYARIT	8,480	8,645	8,148	8,611	9,567	8,645	9,114	16,255	13,831	9,085
BAJA CALIFORNIA SUR	1,990	3,504	5,013	4,765	4,264	4,464	6,150	6,946	7,652	5,920
CAMPECHE	4,222	2,730	3,050	4,044	3,611	6,121	8,155	7,995	7,647	5,130
CHIAPAS	2,405	2,134	1,427	1,990	1,911	1,842	1,724	2,460	1,939	2,758
OAXACA	1,899	2,026	1,405	1,184	1,342	1,683	1,767	1,694	1,549	2,457
VERACRUZ	2,381	2,389	2,605	2,036	2,037	2,086	2,479	1,829	2,020	2,038
OTRAS*	4,664	3,834	3,618	2,945	3,062	2,930	3,498	3,882	4,023	4,296

\* BAJA CALIFORNIA, COLIMA, GUERRERO, JALISCO, QUINTANA ROO, TABASCO Y YUCATÁN.

### I.3.1. *Vibrio parahaemolyticus*

*V. parahaemolyticus* es una bacteria con morfología bacilar, Gram-negativa, curva. En medio líquido suele tener un solo flagelo polar (Baumann, 1984). Se puede encontrar en organismos de ambientes marinos que son populares en la alimentación humana, tales como cangrejos, pulpos, camarones, ostiones, almejas, etcétera. El consumo de esos organismos infectados con *V. parahaemolyticus*, principalmente los que se consumen crudos, provoca en el ser humano enfermedades gastrointestinales tales como diarrea, náusea, junto con dolor abdominal, fiebre, dolor de cabeza y vomito (Su y Liu, 2007).

En el camarón blanco, una cepa de la especie *parahaemolyticus* provoca una enfermedad conocida en un inicio como Síndrome de Muerte Temprana (EMS por sus siglas en inglés), principalmente por provocarla muerte en los organismos en etapas tempranas (Lightner *et al.*, 2012), posteriormente y atendiendo a los signos observables en el camarón se renombró como Enfermedad de la Necrosis Hepatopancreática Aguda (AHPND, por sus siglas en inglés). La cepa que contiene el plásmido codificante se caracteriza por provocar necrosis en el hepatopáncreas, generando inflamación, desprendimiento de células epiteliales tubulares, colonizando a su vez el tracto digestivo y provocando la necrosis en el hepatopáncreas (Cuellar *et al.*, 2012).

Se ha demostrado que el camarón blanco, tanto silvestre como cultivado se infecta por la bacteria causante de la AHPND por las lesiones histopatológicas observadas en los camarones enfermos (Cuellar *et al.*, 2012).

El mecanismo de infección inicia cuando el estómago de los camarones es colonizado por la cepa patogénica, una vez allí, libera dos toxinas llamadas Pir A y Pir B. Una vez acumuladas estas toxinas, generan desprendimientos celulares masivos y agudos en hepatopáncreas, acompañados de necrosis. Estas dos toxinas son producidas y liberadas por las bacterias que presentan el plásmido pVPA3-1, el cual contiene los genes que las codifican. Dichas toxinas son una proteína que guarda una gran analogía estructural con proteínas tipo Cry (Figura 4), por lo que se sugiere un modo de acción similar donde los dominios hidrófobos de la proteína se insertan en la bicapa para formar los poros que dan lugar a la lisis celular (Lee *et al.*, 2015).

Las fases de la enfermedad AHPND pueden desarrollarse en tres fases: aguda, intermedia y terminal (Varela *et al.*, 2017).

**Aguda:** durante esta fase se presentan alteraciones que afectan a la funcionalidad y provocan el desprendimiento celular de los túbulos hepatopancreáticos acompañados de una disminución de actividad mitótica de las células.

**Intermedia:** se detectan masas bacteriales basófilicas y continúa el desprendimiento celular, empiezan procesos inflamatorios.

**Terminal:** se generaliza la destrucción del hepatopáncreas por los desprendimientos celulares y por la acción bacteriana empieza la necrosis.

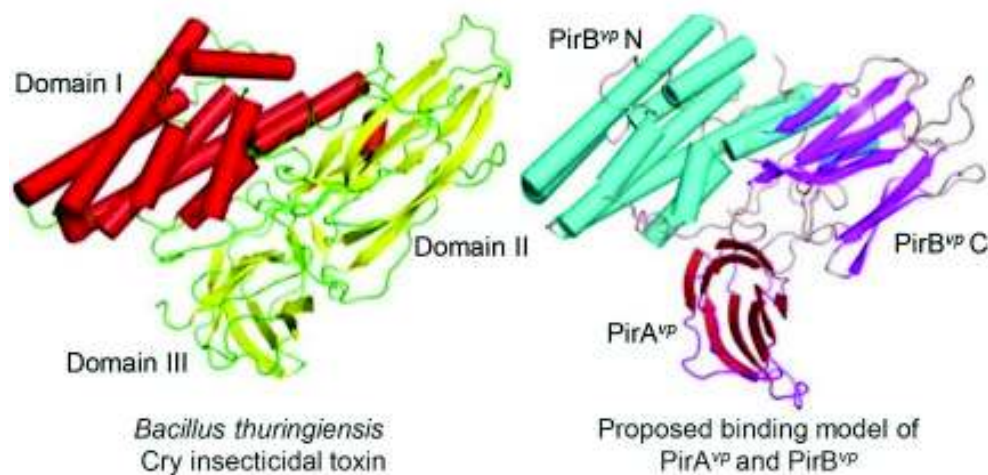


Figura 4. Comparación estructural entre la proteína Cry de *B. thuringiensis* y las proteínas PirA y PirB de *V. parahaemolyticus* (Lee *et al.*, 2015).

### I.3.2. Uso de antibióticos

En la acuicultura se usan diversos tipos de estrategias para tratar y controlar las enfermedades, desde los recambios de agua hasta las buenas prácticas de manejo del personal y monitoreo de la calidad de agua. Todo con la finalidad de tener un buen manejo de los estanques para la reducción de los patógenos en el ambiente para un desarrollo optimo de la práctica acuícola, libre de enfermedades (Cuellar *et al.*, 2010).



El uso de antibióticos en la acuicultura es, en primera instancia, una rápida solución cuando se presenta una enfermedad de índole bacteriana en los camarones, pero el uso excesivo y sin control de antibióticos en la acuicultura ha provocado una presión selectiva en las bacterias, generando con ello microorganismos resistentes a fármacos. Estas bacterias tienen la capacidad de transferir sus genes de resistencia hacia otras bacterias, lo que hace que la problemática de enfermedades bacterianas se vea incrementada.

Tabla 2. Antimicrobianos usados en la acuicultura y su importancia en la medicina humana (Modificado de Heuer *et al.*, 2009).

<b>Agente antimicrobiano</b>	<b>Ruta de administración en acuicultura</b>	<b>Importancia de clase antimicrobiana en medicina humana</b>
Amoxicilina (aminopenicilinas)	Oral	Importancia crítica
Ampicilina (aminopenicilinas)	Oral	Importancia crítica
Cloranfenicol (amphenicol)	Oral/baño/inyección	Importante
Florfenicol (amphenicol)	Oral	Importante
Erythromycin (Macrolides)	Oral/baño/inyección	Importancia crítica
Estreptomina, neomicina	Baño	Importancia crítica
Furazolidona (nitrofuranos)	Oral/Baño	Importante
Nitrofurantoína (nitrofuranos)	Oral	Importante
Ácido oxilínico (quinolonas)	Oral	Importancia crítica
Enrofloxacina (fluoroquinolonas)	Oral/Baño	Importancia crítica
Flumequina (fluoroquinolona)	Oral	Importancia crítica
Oxitetraciclina clortetraciclina, tetraciclina	Oral/baño/inyección	Importancia alta
Sulfonamidas (sulfonamidas)	Oral	Importante

Las bacterias que residen en organismos acuáticos y que son consumidas por el hombre, pueden generar problemas de salud importantes, por lo tanto, es necesario controlar el uso de sustancias generadoras de resistencia en la acuicultura y con ello, evitar el riesgo ecológico y social que podría derivar (Heuer *et al.*, 2009). De aquí que se busque generar sustancias que

puedan controlar los microorganismos sin los efectos secundarios de los antibióticos, como las nanopartículas.

Muchos de los antibióticos o diversos agentes antimicrobianos usados en la acuicultura son de importancia para la medicina humana como se muestra en la Tabla 2.

Los microorganismos a quienes van dirigidos los antibióticos tienen mecanismos mediante los cuales adquieren resistencia. Cuando una población bacteriana se vuelve resistente a algún antibacteriano, la población prolifera y puede transferir los genes responsables a otro grupo bacteriano, obteniendo así la resistencia. Existen 3 procesos principalmente que implican una transferencia lateral de ADN según cita Romero *et al.* (2012).

**Transformación:** las bacterias obtienen genes de ADN foráneo del ambiente externo donde se encuentran.

**Transducción:** las bacterias obtienen genes a través de la infección con ADN viral. Esta alternativa tiene el potencial de desempeñar un papel importante en la transferencia de resistencia debido a las altas concentraciones de virus (bacteriófagos) en hábitats acuáticos, el agua de mar y el sedimento marino.

**Conjugación:** los genes se obtienen por un acoplamiento bacteriano de célula a célula. En este proceso, un plásmido pasa de un organismo a otro a través de un pilus, esto puede ocurrir entre miembros de la misma especie o, lo que lo hace más peligroso, entre diferentes géneros o familias. La propagación de los genes que codifican la resistencia a los antibióticos puede ser facilitada por los transposones, que se mueven de los plásmidos a los cromosomas y en dirección inversa.

Aun con las ventajas que ofrecen los antibióticos de solucionar rápido y eficazmente, en algunos casos, las enfermedades, entre las desventajas del uso de los mismos se encuentra el comprometer la salud del organismo, pues por una parte se busca eliminar una bacteria no deseada en el organismo, pero en otras afecta al organismo, afectando la bioquímica del organismo, como los nitrofuranos que han mostrado características mutagénicas y carcinogénicas en camarón, a su vez que diversos antibióticos pueden provocar cambios en la tasa de alimentación, tasa de respiración, consumo de oxígeno y alteraciones de osmoregulación,

también afectar sus componentes bioquímicos de interés (proteínas, carbohidratos, ácidos grasos, etc.) o incrementa su estrés provocando su muerte (Tu *et al.*, 2010). Pickering y Pottinger en 1989 observaron que el uso de oxitetraciclina (antibiótico de alto espectro usado en la acuicultura) en postlarvas de pez cebra (*Danio rerio*), elevó los niveles de cortisol, lo cual, aunado al estrés, alteró la respuesta inmune de los organismos. En el estudio de Tu *et al.* del 2010 también se habló del problema de los residuos de antibióticos normalmente usados como el cloranfenicol, antibiótico que puede causar aplasia potencialmente falta y leucemia, sin embargo, se han detectado residuos en el musculo del camarón.

#### **I.4. Síntesis verde de nanopartículas**

La investigación en la síntesis de nanopartículas se ha enfocado a producir nanopartículas sin químicos tóxicos y, por lo tanto, difíciles de tratar como residuos, haciéndolos poco eco-amigables. Las síntesis normales o “químicas” suelen usar materiales como etilenglicol, dimetilformamida u otros precursores que pueden dejar trazas en la superficie de la nanopartícula, provocando su toxicidad si se llega a usar en sistemas biológicos; a su vez, suelen elevarse los costos de producción al utilizarse medios de radiación o altas temperaturas, por lo que es una prioridad establecer otros métodos alternativos para la síntesis de nanopartículas para hacerlas viables (Iravani, 2011).

Entre la búsqueda de una síntesis alterna al uso de químicos, se ha desarrollado la síntesis de nanopartículas con microorganismos (He *et al.*, 2007), la cual suele ser tardada, genera un alto costo de producción con elevada posibilidad de contaminación, motivo por el cual recientemente se ha extendido el uso de extractos de plantas en la síntesis de nanopartículas, lo cual se ha denominado fitonanosíntesis.

Las plantas están libres de los inconvenientes mencionados anteriormente. Los extractos de plantas pueden ser obtenidos a gran escala y se pueden purificar los metabolitos responsables de la síntesis de manera más sencilla; además de funcionar como estabilizadores baratos de las nanopartículas, también se ha demostrado que el tiempo de síntesis es menor cuando se usan extractos de plantas y se incrementa la estabilidad de la nanopartícula producida (Song y Kim, 2009).

#### I.4.1. Fitosíntesis

La síntesis de las nanopartículas de plata se basa en un proceso de oxidación-reducción donde los compuestos antioxidantes presentes en las plantas y que actúan como los agentes reductores que transfieren electrones a los iones metálicos provenientes de la solución de nitrato de plata. En la Figura 5-a se ilustra la molécula de Epigallocatequina galato (EGCG), uno de los componentes antioxidantes más abundantes en el extracto de *Rumex hymenosepalus*. La EGCG posee dos anillos con la misma estructura local, el anillo B con una estructura tipo pirogalol o ácido pirogálico y un anillo D con un grupo galato. Ambos anillos tienen tres grupos hidroxilos que potencialmente pueden participar en la síntesis (Wu *et al.*, 2011). El mecanismo de síntesis, considerando un solo anillo, se inicia con la desprotonación de dos grupos hidroxilo en el anillo (Figura 5-b) seguido por una transferencia de electrones, lo cual da lugar a dos electrones desapareados (Figura 5-c). Los protones reaccionan con los dos iones nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) provenientes de la disociación del nitrato de plata lo cual genera dos moléculas de ácido nítrico y a la vez, dos iones de plata  $\text{Ag}^+$  son reducidos a plata metálica  $\text{Ag}^0$  por los electrones transferidos, mientras que el anillo aromático se reconfigura a su forma estable oxidada como quinona (Figura 5-d).

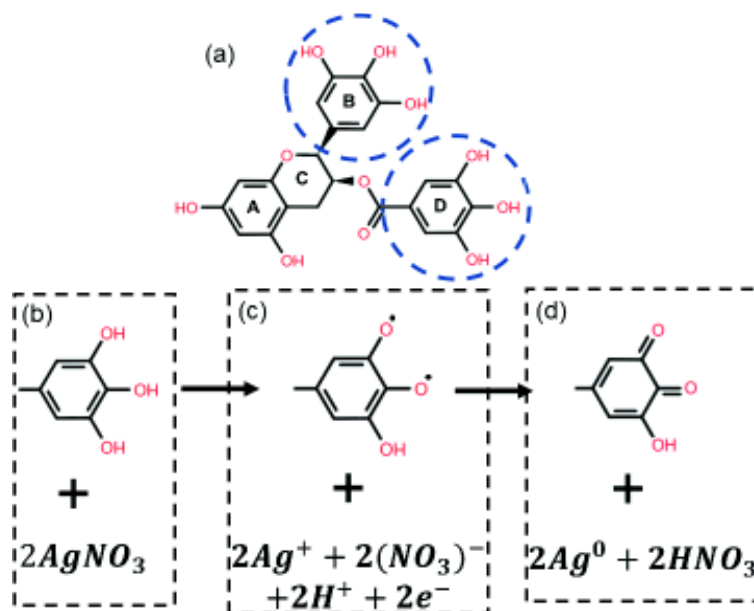


Figura 5. Mecanismo de reacción oxido-reducción que da lugar a la formación de plata metálica  $\text{Ag}^0$ .

En el caso del t-resveratrol, otra molécula abundante en el extracto de *Rumex*, el grupo hidroxilo del anillo fenólico toma parte en la reacción oxido-reducción por un mecanismo análogo al descrito anteriormente para la EGCG, obteniéndose un átomo metálico de plata por cada molécula oxidada de t-resveratrol. La Figura 6-a muestra a la molécula de t-resveratrol en su forma ordinaria y la Figura 6-b, la forma oxidada caracterizada por la formación de un grupo carbonilo.

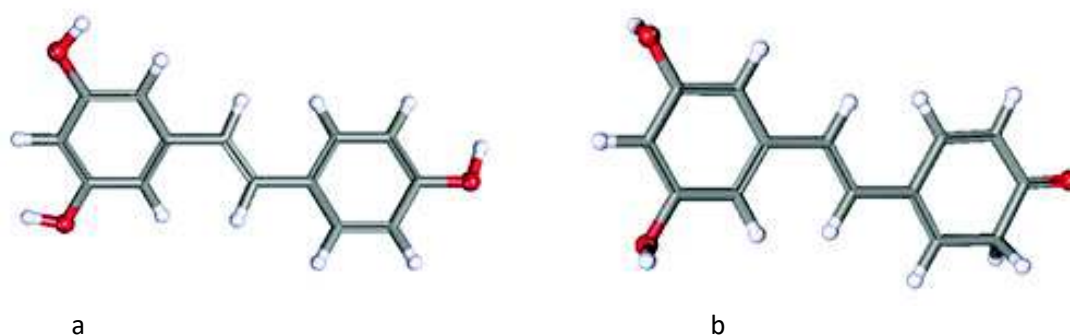


Figura 6. Estructura tridimensional del t-resveratrol sin oxidar (a) y oxidado (b) (Rodríguez *et al.*, 2017).

Las nanopartículas de plata formadas son estabilizadas a través de los grupos carbonilos de las quinonas, previamente formadas por la oxidación de los polifenoles. Las moléculas polifenólicas que están en exceso en la reacción de síntesis promueven la estabilización del material formado al acomplejarse a las nanopartículas mediante los grupos hidroxilos de los anillos aromáticos.

En la Figura 7 se muestra el esquema de una nanopartícula de plata estabilizada por moléculas oxidadas de EGCG y t-resveratrol, así como la participación de especies sin oxidar. Las regiones en verde y amarillo corresponden a los grupos hidroxilos (-OH) y carbonilos (=O), respectivamente, que interaccionan con la superficie de la nanopartícula de plata (Rodríguez *et al.*, 2017).

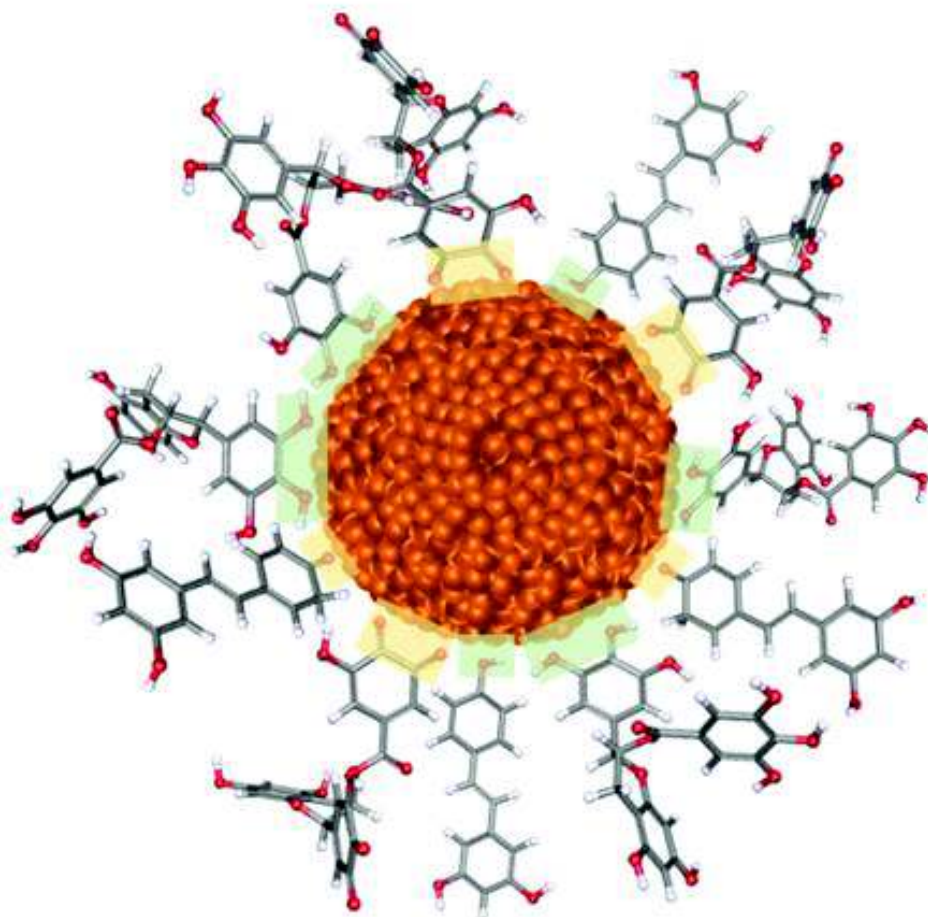


Figura 7. Esquema de la estabilización de nanopartícula de plata por moléculas oxidadas y sin oxidar de EGCG y t-resveratrol, (Rodríguez *et al.*, 2017).

#### I.4.2. Nanopartículas y sus efectos microbicidas

Desde el Siglo XVII se ha utilizado el nitrato de plata para curación de heridas, tratamiento de úlceras y en 1965, se concluyó que una solución de nitrato de plata tenía acción contra bacterias (Klasen, 2000). Actualmente existen diversos estudios acerca de nanopartículas metálicas y su efecto bactericida (Rai *et al.*, 2009; Sondii y Salopek, 2009).

Tabla 3. Mecanismo de acción de nanopartículas de plata contra diferentes microorganismos (Modificado de Francis *et al.*, 2015).

<b>Bacteria</b>	<b>Mecanismo de acción</b>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Alteración de pared celular y citoplasma
<i>Escherichia coli</i>	Alteración de permeabilidad de membrana y respiración
<i>Enterococcus faecalis</i>	Alteración de pared celular y citoplasma
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Alteración de membrana,
<i>Listeria monocytogenes</i>	Cambios morfológicos, separación de membrana citoplasmática de pared celular y plasmólisis
<i>Micrococcus luteus</i>	Alteración de membrana
Nitrifying bacteria	Inhibición de actividad respiratoria
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Alteración de permeabilidad de membrana y respiración
<i>Proteus mirabilis</i>	Alteración de pared celular y citoplasma
<i>Staphylococcus aureus</i>	Inhibición de replicación de ADN bacteriano
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Daño membrana y modificación de ATP a nivel intracelular
<i>Salmonella typhi</i>	Inhibición de replicación de ADN bacteriano y modificación de ATP a nivel intracelular
<i>Vibrio cholerae</i>	Alteración de permeabilidad de membrana y respiración

El mecanismo de acción de las nanopartículas como bactericidas es multifacético, dependiendo de la interacción que se da entre el nanomaterial y la estructura de la membrana, morfología y metabolismo del microorganismo. Se ha estudiado particularmente las nanopartículas de plata y su interacción con distintos microorganismos. Se han propuesto diversos mecanismos de acción de nanopartículas, los cuales se pueden observar en la Tabla 3.

### I.4.3. Nanopartículas en organismos marinos

Existen trabajos donde se llevado a cabo el uso de nanopartículas para monitorear efectos tóxicos o tratar enfermedades en organismos marinos, incluyendo peces, cefalópodos, bivalvos y crustáceos (Canesi *et al.*, 2012; Grimaldi *et al.*, 2013; Kandasamy *et al.*, 2013; Rajan *et al.*, 2017).

Con el auge en producción de productos con nanopartículas y, siendo el mar un área receptora de muchos desechos, es importante conocer los efectos perjudiciales éstos que podrían tener sobre el medio ambiente y la salud. Es por lo tanto que se ha echado mano de organismos marinos como indicadores biológicos de contaminación para estos nanoproductos (Lorenzo, 2014). La aplicación de nanopartículas en cultivos de camarón ha causado que se realicen trabajos para medir la respuesta a nivel metabólico de las nanopartículas. Juárez *et al.* (2017), trabajaron con camarones juveniles a los cuales se les inyectaron nanopartículas de plata y probaron contra el virus de la mancha blanca (WSSV, por su siglas en inglés). Ellos reportaron una supervivencia de 100% en los camarones donde se les administraron los tratamientos con 0.5, 5 y 20µg/ml de nanopartículas de plata sin infección de WSSV; en cambio, reportaron un 80% de supervivencia en organismos que les fue administrado nanopartículas de plata y que fueron infectados con WSSV. En el trabajo anterior, la tasa de consumo de oxígeno y el recuento de hemocitos, previa y posteriormente a la inyección de nanopartículas de plata, se mantuvieron estables e inalterados.

También se han incorporado nanopartículas a dietas para mejorar el desarrollo del organismo, la respuesta inmune, el contenido nutricional y la supervivencia (Srinivasan *et al.*, 2017). Los autores suplementaron una dieta con nanopartículas de óxido de magnesio para la alimentación de postlarvas de langostino gigante (*Macrobrachium rosenbergii*), usando concentraciones de 100 a 500 µg/ml; aumentando por centenas las concentraciones obtuvieron como resultado un aumento de constituyentes bioquímicos como proteínas, carbohidratos, ácidos grasos, aminoácidos en los organismos. En este trabajo se logró aumentar casi al doble la biomasa en aquellos organismos tratados con nanopartículas con respecto al control.



## **I.5. Género *Rumex***

El género *Rumex* se distribuye globalmente y está compuesto en su mayoría por arbustos, y por algunas hierbas. Se han registrado más de 250 especies, en la mayoría se han encontrado fitocompuestos como flavonoides, estilbenoides, entre los que destaca el resveratrol (al cual se le relaciona con protección contra enfermedades cardiovasculares) y taninos (Vasas *et al.*, 2015). Se ha reportado que algunas especies tienen actividad diurética y analgésica (Rao *et al.*, 2011); asimismo, se le atribuyen capacidades antioxidantes, antiinflamatorias, antidiarreica, entre otras (Ferrerres *et al.*, 2006).

### **I.5.1. *Rumex hymenosepalus***

Es conocida con el nombre común de cañagria o hierba colorada. Esta especie (Figura 8), es una planta perenne que se distribuye por el noroeste de México y Suroeste de Estados Unidos. Voelcker (1886), analizó por primera vez la raíz de la *R. hymenosepalus* encontrando un contenido del 23.2% de taninos.

También se han realizado estudios sobre su alta capacidad para el curtido de pieles (Cantúa-Sesteaga, 1987). Se ha utilizado para tratar gingivitis (VanderJagt *et al.*, 2001); e incluso sus hojas son usadas como alimento, para aliviar fiebres y afecciones gastrointestinales. Se le han atribuido propiedades para purificar la sangre al ser ingerida y para tratar quemaduras e irritaciones en la piel usándose tópicamente (Rivero *et al.*, 2005).

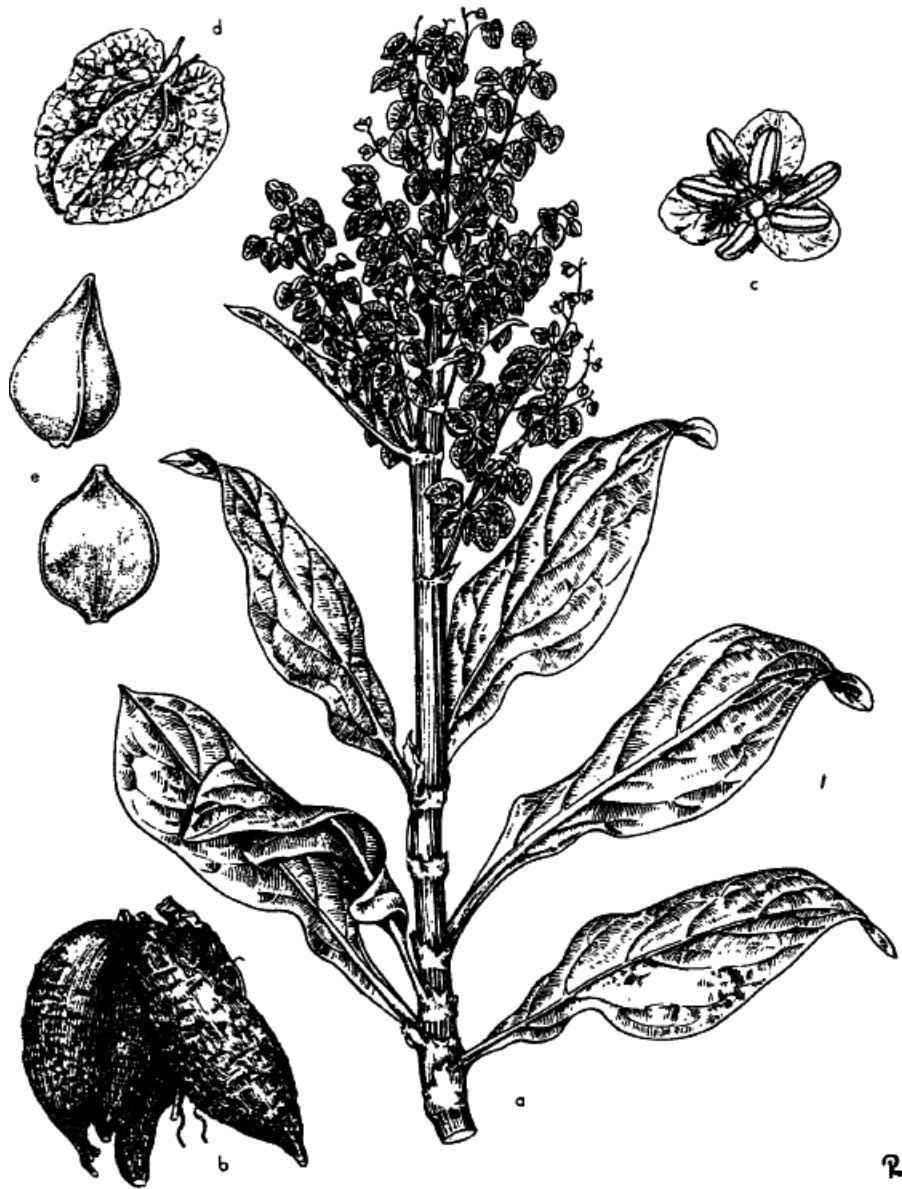


Figura 8. Detalles botánicos de *Rumex hymenosepalus*. a) Toda la planta en flor, b) Raíces, c) Flor, d) Fruto y e) aquenio. (Krochmal y Paul, 1951)

## **II. JUSTIFICACIÓN**

La producción de camarón en los últimos años se ha visto afectada por enfermedades tanto virales como bacterianas. En el caso de bacterias, el tratamiento por excelencia ha sido el uso de antibióticos cuyo manejo implica riesgos sanitarios y ecológicos. En estudios recientes se ha estudiado de la capacidad antimicrobiana de las nanopartículas, por lo que el uso de las nanopartículas puede constituir una alternativa viable a la problemática de control de enfermedades bacterianas y a la generación de resistencia en los cultivos acuícolas.

### **III. HIPÓTESIS**

La síntesis de nanopartículas de plata empleando el extracto de raíz de la planta *Rumex hymenosepalus* genera nanomateriales que tienen propiedades antimicrobianas sobre la bacteria *Vibrio parahaemolyticus* en cultivos *in vivo* de postlarvas de camarones infectadas.

## IV. OBJETIVOS

### IV.1. Objetivo general

Sintetizar nanopartículas de plata con extractos de *Rumex hymenosepalus* y evaluar su uso como estrategia para combatir la enfermedad de la Necrosis Aguda Hepatopancreática (ANHPD), generada por la bacteria *Vibrio parahaemolyticus* en postlarvas de camarón.

### IV.2. Objetivos específicos

1. Obtener y caracterizar el extracto de la planta *R. hymenosepalus*.
2. Sintetizar nanopartículas de plata estables a partir del extracto de *R. hymenosepalus* y establecer su caracterización.
3. Evaluar *in vitro* la capacidad de inhibición del crecimiento bacteriano de las nanopartículas de plata obtenidas y el extracto de *R. hymenosepalus* sobre la bacteria *V. parahaemolyticus*, a través del establecimiento de la concentración mínima inhibitoria.
4. Determinar los posibles efectos de toxicidad de las nanopartículas de plata obtenidas y del extracto de *R. hymenosepalus* en nauplios de *Artemia franciscana*.
5. Evaluar la eficacia de las nanopartículas de plata y del extracto de *R. hymenosepalus* para controlar la infección de *V. parahaemolyticus* en postlarvas de camarón blanco.

## V. METODOLOGÍA

### V.1. Obtención del extracto

La raíz de la planta *R. hymenosepalus* se compró cortada y deshidratada en el mercado local. Las piezas de raíz fueron cortadas en rodajas de aproximadamente 0.5 cm de espesor con diámetros entre 1 y 2 cm (Figura 9). Para obtener el extracto de *R. hymenosepalus* se utilizó una mezcla de etanol/agua en una proporción 70/30 vol/vol. Para la mezcla se utilizó alcohol etílico absoluto ACS marca Fermont. En un frasco transparente de cultivo con tapón de rosca hermética se colocaron 1000 mL de la mezcla etanol/agua, donde se sumergieron 15 g de rodajas deshidratadas del tubérculo de la planta. El frasco se dejó herméticamente cerrado para evitar evaporación de los componentes durante tres semanas para que se llevara a cabo la extracción de los compuestos presentes en la raíz. El frasco con su contenido se cubrió con papel aluminio y se colocó en un lugar cerrado alejado de la luz para evitar la foto-oxidación de los compuestos obtenidos en el extracto. Mediante decantación se separó la parte líquida, la cual se filtró posteriormente a través de papel filtro Whatman grado 40 (retiene partículas de 8  $\mu\text{m}$ ) y finalmente se pasó por un filtro Acrodisc de 200 nm acoplado a una jeringa. El extracto final se caracterizó por UV-Vis.



Figura 9. Cortes de raíz de *Rumex hymenosepalus* presentando las tonalidades rojizas interna y café externo características.

## **V.2. Síntesis de nanopartículas de plata empleando extractos de *Rumex hymenosepalus***

Como reactivo aportador de los iones de plata se utilizó Nitrato de Plata de alta pureza (99.9%) de Sigma Aldrich. Se prepararon 1000 mL de una solución 0.1 M de  $\text{AgNO}_3$  empleando agua ultrapura (18.2 M $\Omega$ ) a 25°C. Para preparar las nanopartículas de plata, se agregaron en un frasco transparente de 100 mL con tapón de rosca, 4 mL del extracto de *Rumex*, 2 mL de la solución de Nitrato de Plata 0.1 M y 16 mL de agua Ultrapura. El frasco se colocó en el exterior durante una hora expuesto a la luz del sol. El frasco se rotó manualmente de manera parcial sobre su eje cada 15 minutos para que la iluminación fuera lo más homogénea posible sobre la muestra. Pasado el tiempo, el contenido del frasco se colocó por partes iguales en dos tubos Falcon de 15 mL para su posterior centrifugación. Antes de centrifugar, se tomó una alícuota de 0.5 mL de cada tubo para realizar la caracterización de las nanopartículas por UV-VIS.

El proceso de la centrifugación tuvo como propósito “limpiar” las nanopartículas del material excedente proveniente del extracto y de la solución. Previo a la centrifugación, el contenido en los tubos Falcon fue sonicado durante 10 minutos en una cuba de ultrasonificación Marca Fisher Scientific FS-60 con una potencia de ultrasonificación de 130 W a una frecuencia de 40 KHz, con la finalidad de homogenizar completamente la muestra, posteriormente, se centrifugó por 30 minutos a 6,000 rpm. El sobrenadante se retiró y los sólidos precipitados se resuspendieron en 10 mL de etanol. Se sonicó de nuevo el contenido de los tubos con los sólidos precipitados con el alcohol por 10 minutos para volver a centrifugarse en las mismas condiciones. Los sólidos se recuperaron y se dejaron secar por 24 horas en un desecador con vacío. Los polvos se pesaron y se re suspendieron en 1 mL de agua ultrapura para su posterior uso en las pruebas de actividad microbiciada y para su caracterización por UV-Visible, así como por microscopía electrónica de transmisión (MET) y microscopía electrónica de barrido (MEB).

## **V.3. Caracterización del extracto y nanopartículas de plata (AgNps) por UV-Vis**

Para el extracto se pesaron 0.001 g en 10 mL de extracto liofilizado de *Rumex* de los cuales se tomaron 10  $\mu\text{l}$  para depositar en una celda de cuarzo y se depositó agua ultrapura para tener un volumen final de 3000  $\mu\text{l}$ , los espectros se corrieron de 900 a 200 nm con una velocidad de paso

de 480 nm por minuto a 25°C y con un ancho de abertura de haz de 0.5 nm. Se utilizó agua ultrapura como blanco de referencia.

Para AgNps se tomaron 250 µL de una solución madre de 880 µg/mL y se completó el volumen de la celda de cuarzo una solución de 70/30 de etanol/agua. Los espectros se corrieron de 900 a 200 nm con una velocidad de paso de 480 nm por minuto a 25°C y con un ancho de abertura de haz de 0.5 u.a. Se utilizó una solución de 70/30 de etanol/agua como blanco de referencia.

#### **V.4. Espectroscopía infrarroja (IR) del extracto y AgNPs**

Los experimentos de espectroscopía IR por transformada de Fourier se efectuaron en un equipo Perkin-Elmer FT-IR, modelo System Spectrum GX, empleando una celda de CaF<sub>2</sub>. Los espectros se obtuvieron en modo de Transmitancia en la región comprendida entre 4000 cm<sup>-1</sup> a 500 cm<sup>-1</sup> a una resolución de 0.3 cm<sup>-1</sup>.

#### **V.5. Caracterización de las AgNPs por Microscopía Electrónica de Transmisión**

La caracterización de las nanopartículas por microscopía de transmisión se efectuó en un microscopio Jeol de emisión de campo, modelo 2010F. El equipo cuenta con un corrector de aberración esférica que permite una resolución espacial de punto a punto de 0.19 nm. El voltaje de operación del equipo durante la caracterización de las muestras fue de 200 KV. Se depositaron 10 µL de la solución de nanopartículas sobre una rejilla de cobre de 300 mesh (densidad de entramado) cubierta con una película de carbón como soporte. Se dejó secar la muestra sobre la rejilla a temperatura ambiente hasta asegurar la evaporación del solvente (12 h) y posteriormente se guardó en tubo Eppendorf (1.5 mL) hasta su observación.



## V.6. Obtención de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de AgNPs y del extracto de *R. hymenosepalus*

En el presente trabajo se utilizó una cepa de la bacteria *V. parahaemolyticus* patogénica aislada de camarones que padecieron la ANHPD, donada por el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) (Félix *et al.*, 2017) y caracterizada en el Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR) (León *et al.*, 2016).

Para la prueba de la CMI (concentración mínima inhibitoria) se utilizó un lector de placas de 96 pozos marca SYNERGYHTX (Figura 10). En cada pocillo se depositaron 50  $\mu$ L de caldo Mueller Hinton (DIFCO) y 30  $\mu$ L de tratamiento (AgNPs o Extracto de Rumex), variando su concentración para localizar el CMI y 20  $\mu$ L de inóculo de la bacteria *V. parahaemolyticus* a una concentración de  $10^5$  cel/mL. En el caso de los blancos, en los pocillos solamente se depositó la mezcla de solventes. Se configuró el equipo para mantener una temperatura de incubación de 30 °C, realizar una agitación por 5 segundos en movimiento lineal durante cada lectura. El experimento tuvo una duración de 24 h con lecturas automáticas cada 15 min, a una longitud de onda de 540 nm. Para los blancos se colocaron tratamientos sin infección.

Para evaluar la CMI se utilizaron concentraciones de AgNPs de 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 35  $\mu$ g/mL; para el extracto de *Rumex* se utilizaron concentraciones de 88, 100, 110, 330  $\mu$ g/mL.



Figura10. Incubadora SYNERGYHTX para la evaluación de la Concentración Mínima Inhibitoria de las nanopartículas de plata y del extracto de *Rumex*.

### V.7. Nauplios de *Artemia franciscana* y prueba de toxicidad

En el presente trabajo se utilizaron quistes de *Artemia franciscana* de marca INVE como vector de las AgNPs y del extracto de *Rumex* para las postlarvas de camarón, se utilizaron nauplios de *Artemia franciscana* recién eclosionados (24-36 horas post-eclosión) para lo cual se eclosionaron 0.5 gramos de quistes de *Artemia* en un matraz con aireación e iluminación constantes conteniendo 500 mL de agua de mar diluida a 25 partes por mil (‰) (esterilizada en autoclave), a una temperatura de 30°C por 48 h. Los nauplios fueron cosechados y lavados exhaustivamente con agua de mar estéril (para reducir su carga bacteriana) y resuspendidos nuevamente en 500 mL en agua de mar estéril en un matraz limpio. Antes de su uso experimental se estimó la densidad de nauplios en el recipiente.

Para la prueba de toxicidad se colocaron en promedio 25 nauplios de *Artemia* por pozo en una placa de seis pozos (de 10 mL cada uno). Cada pozo contenía: 4.5 mL de agua de mar a 35‰, 1 mL de alícuota de la solución madre de los nauplios de *Artemia* y 0.5 mL de tratamiento para un volumen final de 6mL por pozo y concentraciones de 44 y 50 µg/mL de nanopartículas y 220 y 240 µg/mL del extracto de *R. hymenosepalus* (Figura 11). Cada tratamiento se realizó por triplicado. Los nauplios de *Artemia* fueron observados y contabilizados cada seis horas a través de un estereoscopio durante las 24 horas del experimental. Al final del experimento, se registró el número de nauplios activos (vivos) y se calculó el porcentaje de supervivencia para cada pozo y experimento por separado.



Figura 11. Sistema experimental para las pruebas de toxicidad con nauplios de *Artemia*.

## V.8. Reto bacteriano experimental con postlarvas de camarón blanco, *L. vannamei*

### V.8.1. Reto bacteriano preventivo en postlarvas de camarón

Las postlarvas de camarón blanco, *L. vannamei*, en estadio de postlarva 15 (Pl 15, quince días en la etapa de postlarva) (Figura 12), fueron obtenidas del cultivo larvario de la empresa GENITECH, S.A de C.V. ubicada en la costa de Hermosillo, en el poblado del Colorado. Los organismos fueron trasladados en bolsas plásticas a baja temperatura (aprox. 10 °C), de acuerdo al protocolo de la empresa, al laboratorio de acuicultura del Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (DICTUS) y fueron colocadas en un recipiente plástico de 250 litros, previa aclimatación de los organismos por la salinidad y temperatura del envío.

Los organismos una vez aclimatados (salinidad 35 ‰ y temperatura de 30°C) permanecieron en las instalaciones del DICTUS por 5 días bajo aireación y alimentación comercial permanentes previos a su uso en el reto bacteriano. Paralelamente se eclosionaron quistes de *Artemia*, de acuerdo a lo establecido anteriormente. Los nauplios recién eclosionados se dividieron en placas petri con un volumen total de 10mL a los cuales se les administraron los tratamientos de 25 µg/mL y 220 µg/mL de AgNPs y de extracto de *R. hymenosepalus*, respectivamente, durante 18 h. Los nauplios de *Artemia* se mantuvieron bajo temperatura y aireación constante.

Previo al reto bacteriano, se colocaron dos grupos con 300 Pl 20 en dos vasos de precipitado de 500 mL, conteniendo 250 mL de agua de mar a 35‰ estéril bajo aireación suficientes cada uno. Se colocaron 50 nauplios de *Artemia* tratados por postlarvas de camarón en cada vaso (aproximadamente 15,000 nauplios en total) y se permitió que las postlarvas se alimentaran con ellos por 4 h. Posteriormente, se colocaron nueve Pl 20 de las alimentadas con nauplios de *Artemia* tratados en cada uno de los matraces experimentales de 500 mL conteniendo un volumen de 300 mL de agua de mar a 35 ‰ estéril con aireación suficiente a una temperatura controlada de 30 °C (Figura 13). Los tratamientos experimentales fueron por triplicado y distribuidos al azar por la línea de tratamiento de los nauplios de *Artemia* (alimentados con AgNPs o extracto de *Rumex*). Una vez colocadas las postlarvas de camarón, inmediatamente cada matraz se infectó con un inóculo de 24 h de cultivo en caldo Muller Hinton (DIFCO) de la cepa de *V. parahaemolyticus*, para una concentración final de 10<sup>5</sup> cel/mL. Se

utilizó como blanco positivo tres matraces con Pl 20 alimentadas de inicio con nauplios de *Artemia* sin tratamiento y sin inóculo bacteriano y como Blanco negativo, Pl 20 alimentadas con nauplios sin tratamiento con el inóculo bacteriano. Durante el experimento se contabilizaron las Pl 20 activas (vivas) cada 6 horas durante 28 h para calcular su supervivencia. Al finalizar el experimento se recolectaron todos los organismos y se fijaron en solución de gluteraldehído al 4% para su posterior observación por microscopía electrónica de transmisión.



Figura 12. Especimen de Postlarva 20 de camarón blanco, *Litopenaeus vannamei*, utilizada en el reto bacteriano observada por estereoscopio.



Figura 13. Sistema experimental de camarones.

#### V.8.2. Reto bacteriano correctivo en postlarvas de camarón

Para este experimento se utilizaron postlarvas de 25 días se colocaron, de igual manera que en el experimento anterior, nueve organismos en cada uno de los matraces experimentales con un volumen de 300 mL de agua de mar estéril de 35 ‰. Los tratamientos experimentales fueron distribuidos al azar. En este bioensayo, primero se colocaron las postlarvas de camarón e inmediatamente después se infectaron con un inóculo fresco de *V. parahaemolyticus* para dar una concentración de  $10^5$  cel/mL. A las 4 h posteriores a la infección, se les suministraron nauplios *Artemia* con 48 h de eclosión y tratados de manera similar que en el bioensayo anterior (ver sección VI.6.1), a una densidad de 50 nauplios de *Artemia* por postlarva de camarón. Cada tratamiento fue por triplicado. Los matraces se colocaron en un sistema de aireación y se controló la temperatura ambiente a 30 °C. Se contabilizó la supervivencia cada 6 h durante 28 h. Al finalizar el experimento se recolectaron los organismos y fueron fijados en glutaraldehído para la caracterización en MET.

### V.9. Preparación de muestra para MET y MEB

El análisis por MET y MEB de los organismos fijados con gluteraldehído se realizó en la University of Texas at San Antonio. Para este fin, los organismos por tratamientos se colocaron en una caja petri bajo una campana de extracción para obtener el hepatopáncreas utilizando un bisturí. El intestino se cortó en forma transversal y longitudinal (Figura 14).



Figura 14. Corte y toma de muestra de camarón.

Los cortes de tejidos fueron colocados en tubos eppendorf de 2 mL y se realizaron dos lavados consecutivos con PBS (Phosphate-buffered saline) por 15 min cada uno. Posteriormente se retiró el PBS y se depositó en el tubo una solución de  $\text{OsO}_4$  al 1% en PBS por una hora con la finalidad de teñir la muestra de tejido para ser observada por MET y MEB. Se retiró el  $\text{OsO}_4$  y se realizaron dos lavados con PBS por 15 min cada uno para retirar el exceso del tetraóxido de osmio, posteriormente se realizó una serie de lavados consecutivos con etanol a concentraciones de 25, 50, 75, 95 y 100 % por 15 min cada uno (tomando como base el etanol al 96%) (Figura 15) La finalidad de los lavados con etanol es para remplazar el agua que tienen las muestras y la resina pueda ingresar. Posterior a los lavados con etanol, las muestras se lavaron con óxido de propileno (Aldrich Chemistry), dos veces durante 15 min cada una para remover el etanol; después se colocaron los tejidos durante una hora en una mezcla 50:50 de

óxido de propileno con la resina LX-112. Esta resina se prepara previa a su uso. Finalmente, las muestras se colocaron en un eppendorf para darle orientación y colocar la resina LX-112 con un catalizador incluido para polimerización de la resina. Las muestras con la resina se colocaron en un horno a 60°C durante 48 h. Durante la preparación, en el paso de los lavados con etanol, se tomó una muestra de 20  $\mu\text{L}$  y se depositó sobre una rejilla de cobre con cubierta de carbono y se dejó secar para su observación por MEB (Figura 16).



Figura 15. Serie de lavados.

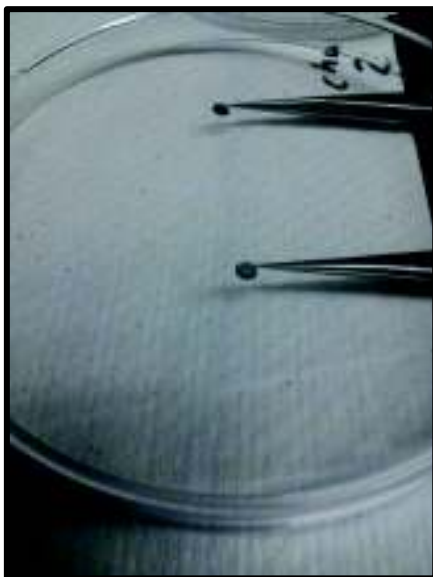


Figura 16. Rejillas secándose para ser observadas en MEB.

### **V.10. Corte y montaje de muestra para MET**

Una vez en estado sólido la resina se llevó a un ultramicrotomo (Figura 17), donde se realizaron cortes ultrafinos de un espesor de 90 nm con una hoja de diamante y fueron recogidos con una rejilla de cobre con recubierta de carbono para observarse en el microscopio electrónico de transmisión (MET).



Figura 17. Muestra sólida teñida (Izquierda) y Ultramicrotomo (Derecha).

### **V.11. Observación por microscopio electrónico de transmisión (MET) y microscopio electrónico de barrido (MEB)**

Los cortes de camarón fueron observados en diferentes modelos de microscopios electrónicos de transmisión y de barrido, MET JEOL 1230, MET JEOL 2010 y Hitachi 5500 (Figura18).





Figura 18. Equipo METJEOL 1230 (izquierda) y MEB HITACHI 5500 (derecha).

## V.12. Análisis estadístico

El tratamiento estadístico de las pruebas de *Artemia* y camarón se llevó a cabo a través de un ANOVA de una sola vía realizándose una prueba Post Hoc de Tukey para verificar si existía diferencia estadísticamente significativa; para ello se utilizó el software estadístico de Statgraphics Centurion XVII y Origin Pro 8.6.

## VI. RESULTADOS

### VI.1. Extracto de *Rumex hymenosepalus*

#### VI.1.1 Espectro UV-Vis el extracto

Con el fin de descartar la pérdida de componentes en la muestra de *R. hymenosepalus* seca, se analizó una muestra fresca de producto. Los espectros UV-Visible de ambos extractos, fresca y comercial, se muestra en la Figura 19. El espectro completo comprende desde los 200 hasta los 900 nm. Se observa una banda bien definida entre 250 -350 nm.

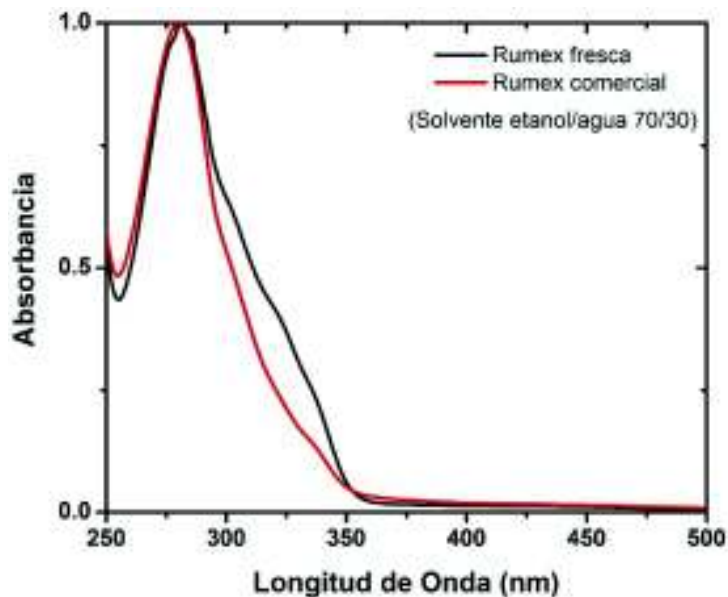


Figura 19. Espectros UV-Visible de los extractos de *R. hymenosepalus*, comercial y fresca obtenidos con una mezcla de solventes etanol/agua (70/30).

#### VI.1.2. Espectro IR del extracto y AgNPs sintetizadas

La Figura 20 muestra los espectros IR del extracto de *Rumex hymenosepalus* (Rh) y de las AgNPs sometidas al proceso de limpieza. Se observa una banda ancha entre  $3750\text{ cm}^{-1}$  y  $3000\text{ cm}^{-1}$ , la cual corresponde a los modos de estiramiento del grupo OH presente en los anillos

fenólicos de las moléculas del extracto. Los picos ubicados a 2974, 1650 y 1384  $\text{cm}^{-1}$  corresponden a los modos de estiramiento de los enlaces C-H, C=C y C-O, respectivamente, asociados a los anillos aromáticos. La señal a 1049  $\text{cm}^{-1}$  se asocia al modo de estiramiento del enlace C-O-C del grupo éter de las moléculas de catequina y el pico a 799  $\text{cm}^{-1}$  corresponden al estiramiento del grupo -OH fuera del plano en los anillos fenólicos.

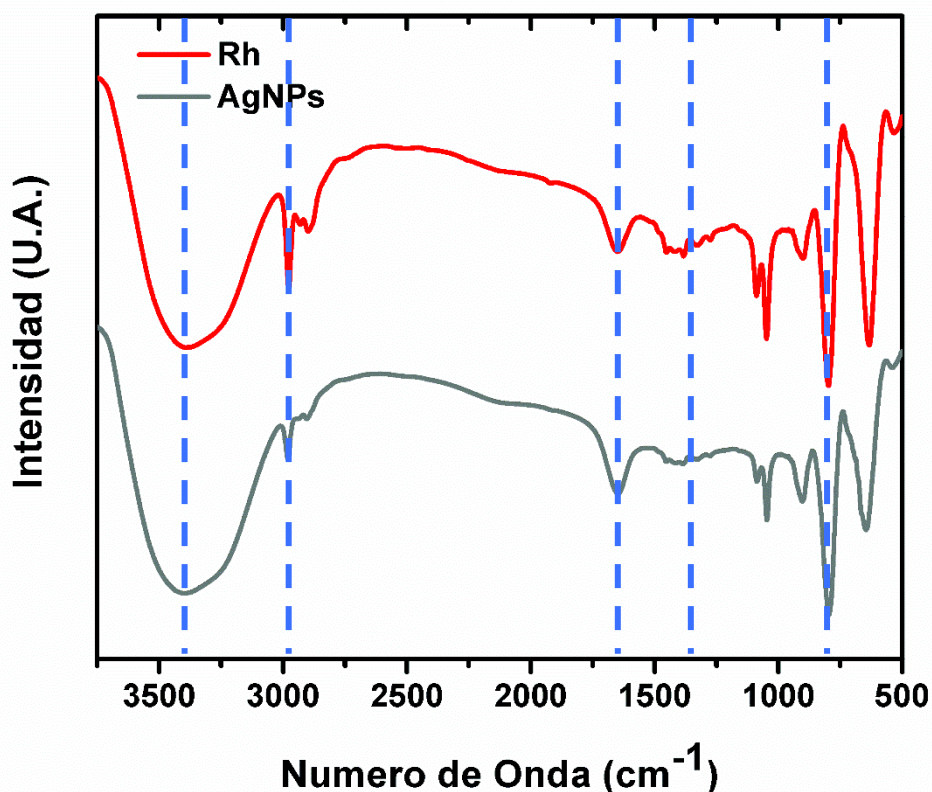


Figura 20. Espectro IR del extracto de *R. hymenosepalus* y de las AgNPs sintetizadas y sometidas a proceso de limpieza.

## VI.2. Nanopartículas sintetizadas

### VI.2.1. Nanopartículas resultantes de síntesis

Como resultado de la exposición a la luz, posterior en la síntesis, la solución de nanopartículas adquiere una tonalidad café oscuro (Figura 21). Se obtiene un material de color café debido a la

absorción de la luz como consecuencia debido al plasmon de resonancia de superficie de la AgNps plata.



Figura 21. Coloración de la solución con nanopartículas posterior a la síntesis.

#### VI.2.2 Caracterización de AgNPs por espectroscopía UV-Vis

En la Figura 22, se muestra el espectro UV-Vis de las AgNPs obtenidas de la síntesis con extractos de *R. hymenosepalus*. La banda muestra las nanopartículas después de todo el proceso de purificación. Esta presenta un pico máximo a una longitud de onda de 415 nm, pico asociado a las AgNPs.

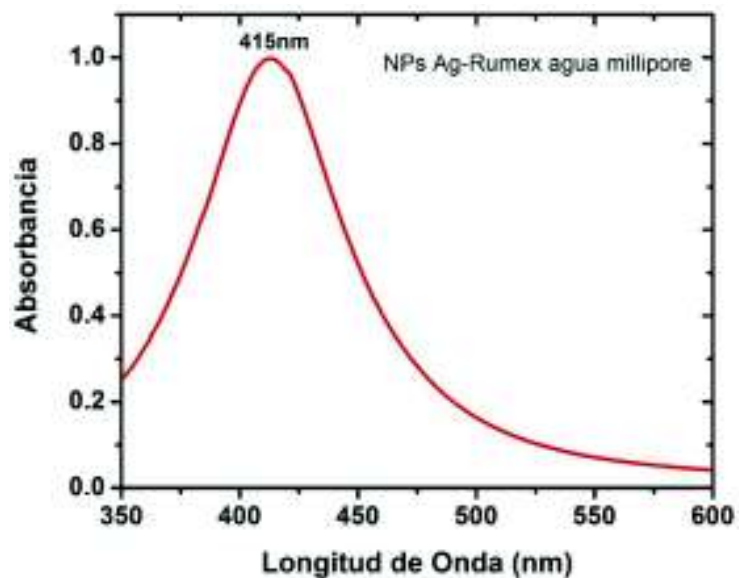


Figura 22. Espectro UV-Visible de las AgNPs obtenidas de la síntesis con extractos de *R. hymenosepalus*.

### VI.2.3. Caracterización de AgNps por microscopía electrónica de transmisión y de barrido

Las Figuras 23-a y 23-b corresponden a micrografías de las AgNPs sintetizadas con el extracto de *R. hymenosepalus*. Las imágenes se obtuvieron por microscopía electrónica de transmisión (MET) y en ellas se muestra que las partículas son de geometría cuasiesférica y se encuentran bien dispersas sin formar aglomerados entre sí. En la Figura 23-c se muestra el histograma correspondiente a la distribución de tamaños de las nanopartículas construido con un total de 400 nanopartículas empleando el software ImageJ para el procesamiento y análisis de las micrografías. El tamaño promedio de las nanopartículas es de  $4.9 \pm 1.4$  nm con tamaños comprendidos entre 2 nm y 10 nm.

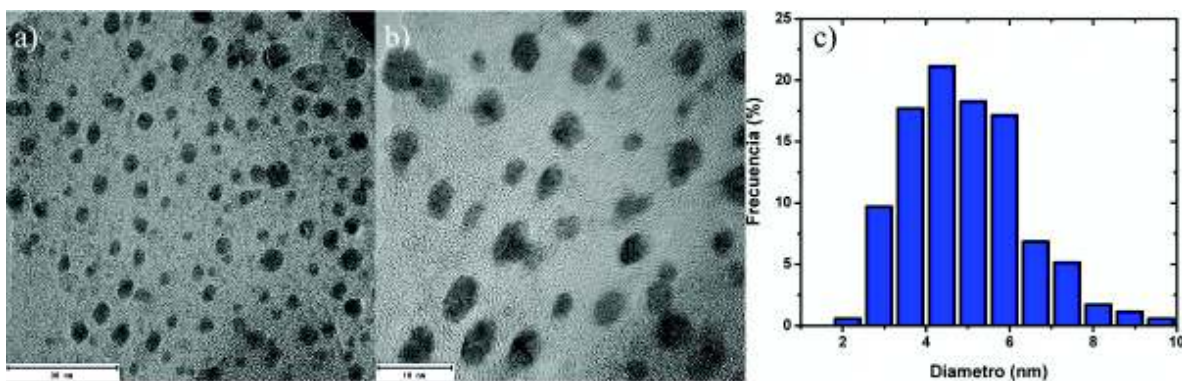


Figura 23. Micrografías de MET de la AgNPs sintetizadas a distintas ampliaciones (a,b). La gráfica en c) corresponde a la distribución de tamaños de las nanopartículas.

En las Figuras 24-a y 24-b se observa la imagen MET de una región de AgNPs y su correspondiente patrón de difracción electrónica de área selecta. Del análisis de la Figura 24-b se obtuvo que los anillos de difracción corresponden a los planos cristalinos, cuyos índices de Miller son señalados, de la estructura cúbica centrada en las caras (fcc) de la plata de acuerdo a la ficha cristalográfica 04-0783 del Centro Internacional de Datos de Difracción (ICDD).



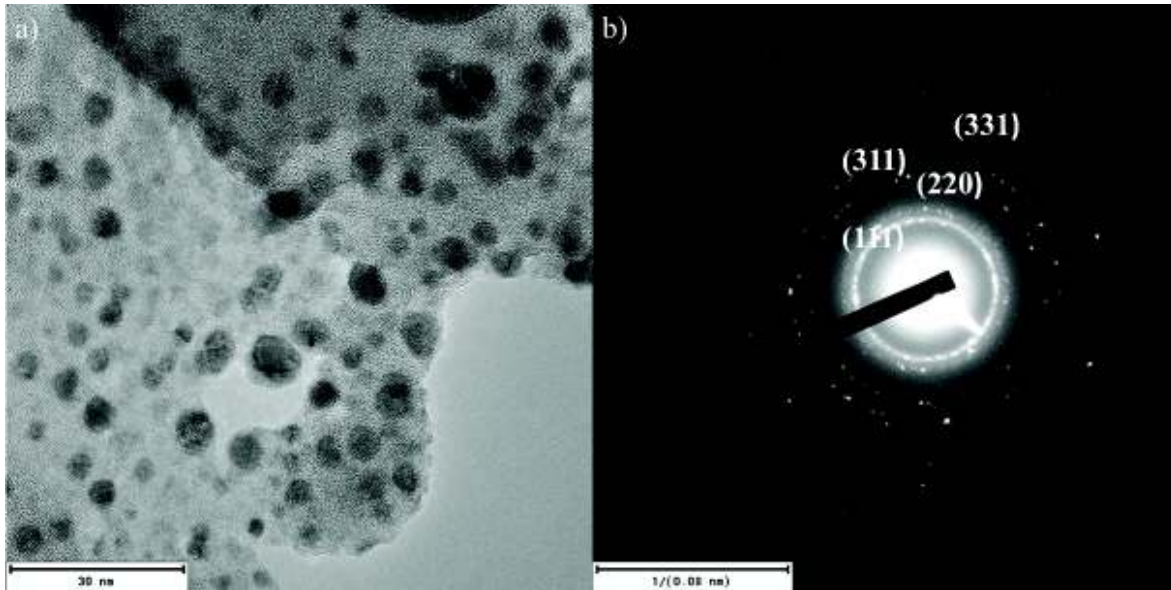


Figura 24. Micrografía MET de nanopartículas de plata (a) y su correspondiente patrón de difracción electrónica de área selecta (b).

Las imágenes de la Figura 25 corresponden a micrografías de MET de alta resolución de un conjunto de AgNPs (Figura 24-a) y de una nanopartícula individual de plata (Figura 24-b). En ambas imágenes son claramente identificables los planos cristalinos cuyas distancias se determinaron mediante el procesamiento de las imágenes usando el software Digital Micrograph. En todos los casos se obtuvo una distancia  $d=2.3 \text{ \AA}$ ; los planos cristalográficos empleados en la determinación de dicha distancia se muestran en rojo. En el recuadro de la figura 24-b se muestra la imagen correspondiente a la transformada rápida de Fourier (FFT) de la nanopartícula individual de plata. Se observa que la difracción obtenida corresponde al plano (111) de la estructura cristalina fcc de la plata.

En la Figura 26, se puede apreciar las nanopartículas envueltas y estabilizadas por el extracto que al pasar al modo de transmisión (figura de la derecha) se puede observar el interior donde se logran apreciar las nanopartículas de plata.

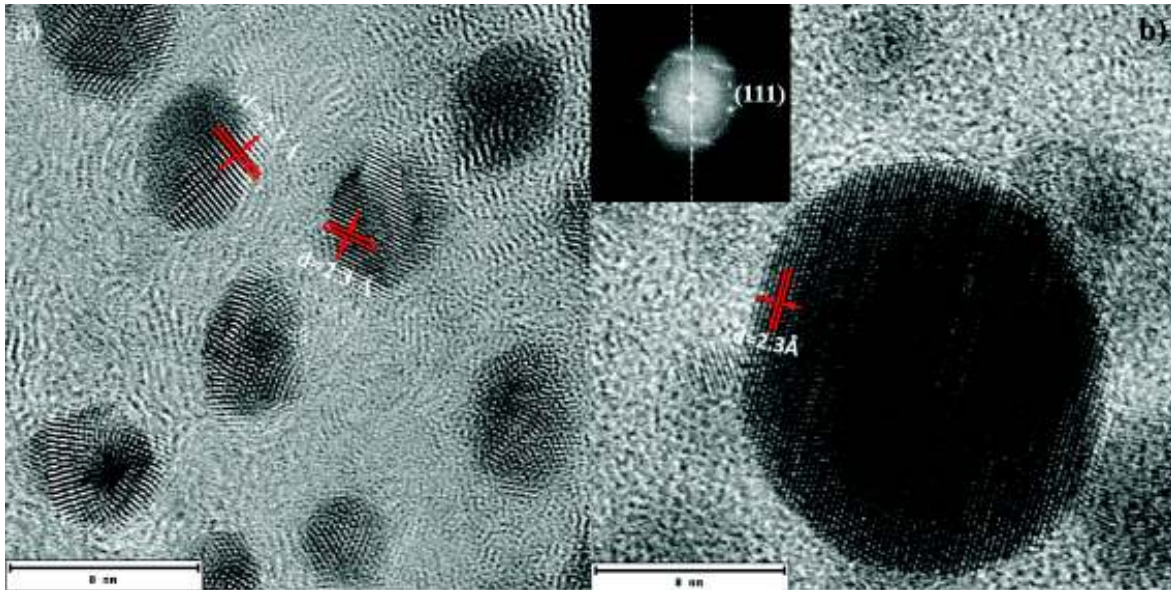


Figura 25. MET de alta resolución de un conjunto de nanopartículas de plata (a) y de una partícula de plata individual (b). En el recuadro de la Figura 24-b se muestra la transformada rápida de Fourier de la nanopartícula individual de Ag.

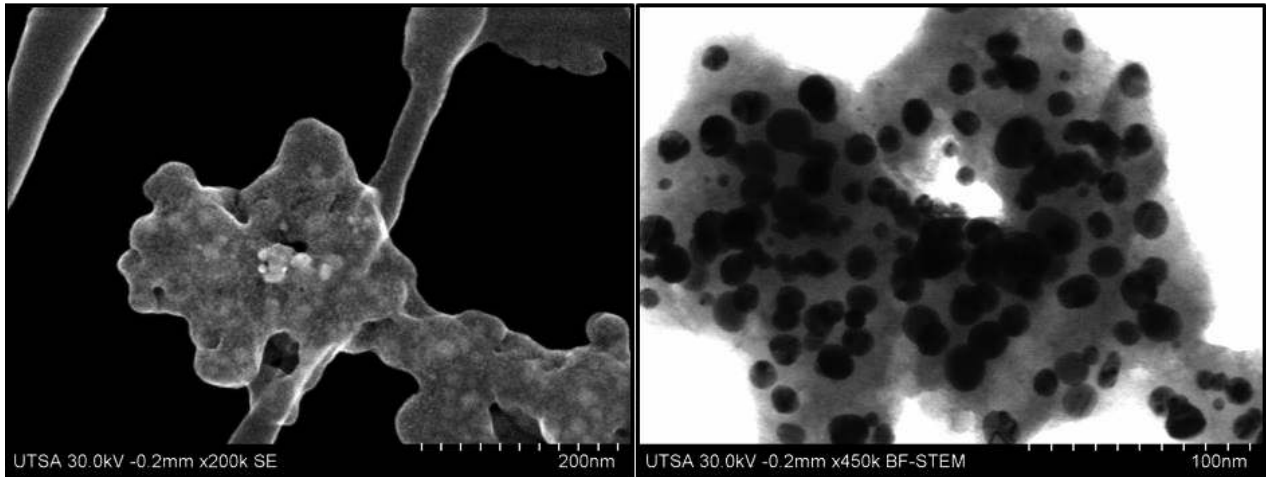


Figura 26. Nanopartículas de plata envueltas en el extracto de *R. hymenosepalus* observado por MEB y vista externa de las nanopartículas recubiertas por extracto (figura de la izquierda). En la figura de la derecha se aprecia la vista interna de la matriz donde se aprecian nanopartículas de plata.

### VI.3. Inhibición bacteriana por AgNPs y extracto de *R. hymenosepalus*

En la Figura 27 se puede observar el comportamiento de la cepa de la bacteria *V. parahaemolyticus* utilizada en el trabajo ante las diferentes concentraciones de nanopartículas de plata. Conforme se aumentó la concentración de AgNps, existe un retardo en la fase de crecimiento de la bacteria, haciendo patente el efecto tóxico de la sustancia, de tal manera que a la concentración de 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de AgNps la bacteria ya no presentó crecimiento. De igual manera, se observa el mismo comportamiento de la bacteria ante el extracto puro de *R. hymenosepalus*. En este caso la concentración inhibitoria del crecimiento de la bacteria, se estableció entre 110  $\mu\text{g}/\text{mL}$  donde se observa un aletargamiento del crecimiento bacteriano y 330  $\mu\text{g}/\text{mL}$  donde no se presenta crecimiento alguno (Figura 28).

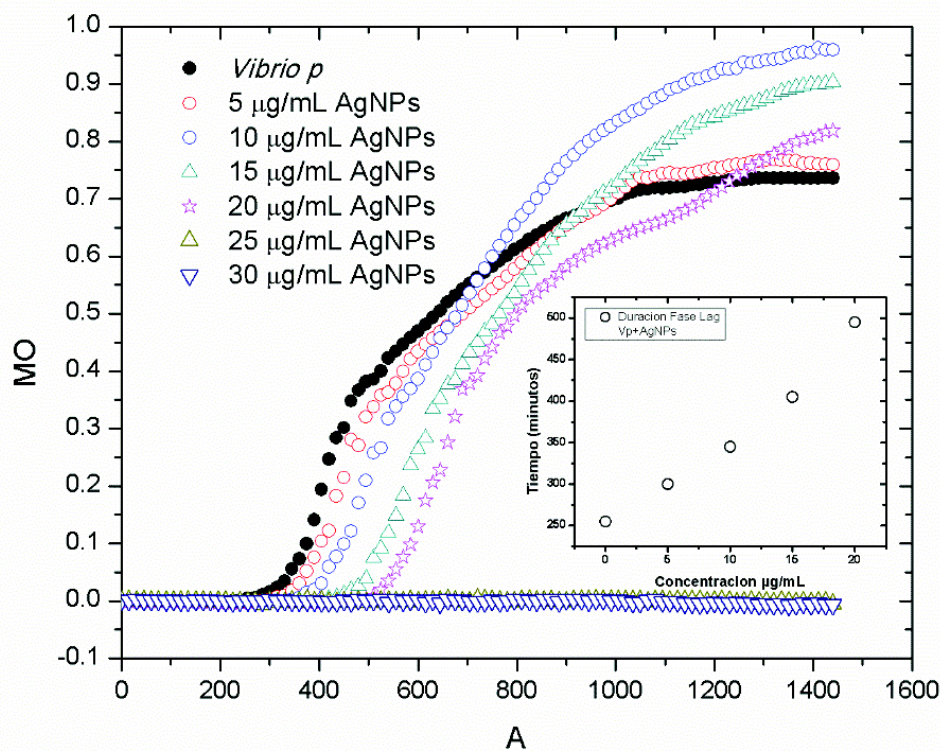


Figura 27. Comportamiento de la cepa de la bacteria *V. parahaemolyticus* de prueba ante diferentes concentraciones de AgNPs con extracto de *R. hymenosepalus*.



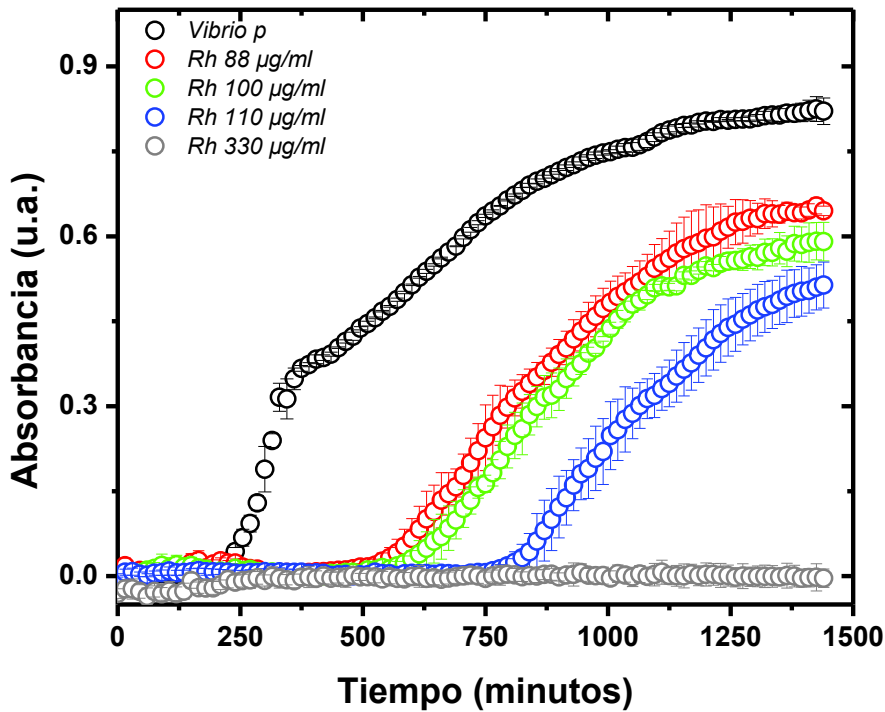


Figura 28. Comportamiento de la cepa de la bacteria *V. parahaemolyticus* de prueba ante diferentes concentraciones del extracto de *R. hymenosepalus*.

### VI.3.1 Análisis de *V. parahaemolyticus* bajo MET y MEB

El cultivo de la cepa de la bacteria *V. parahemolyticus* fue tratado con una concentración de 100µg/ml de AgNPs para lograr observar el mecanismo e interacción y fijada con gluteraldehído al 4%, fue procesado para generar cortes ultra finos (<90 nm) en un Ultramicrotome Leica Reichert Ultracut para ser observados bajo microscopía electrónica de transmisión. En la Figura 29 se puede observar en el interior de las bacterias la presencia de AgNPs (29 a) en lo que aparenta ser la membrana celular, mientras que la muestra control (29 b) no se observan nanopartículas de plata en su interior.

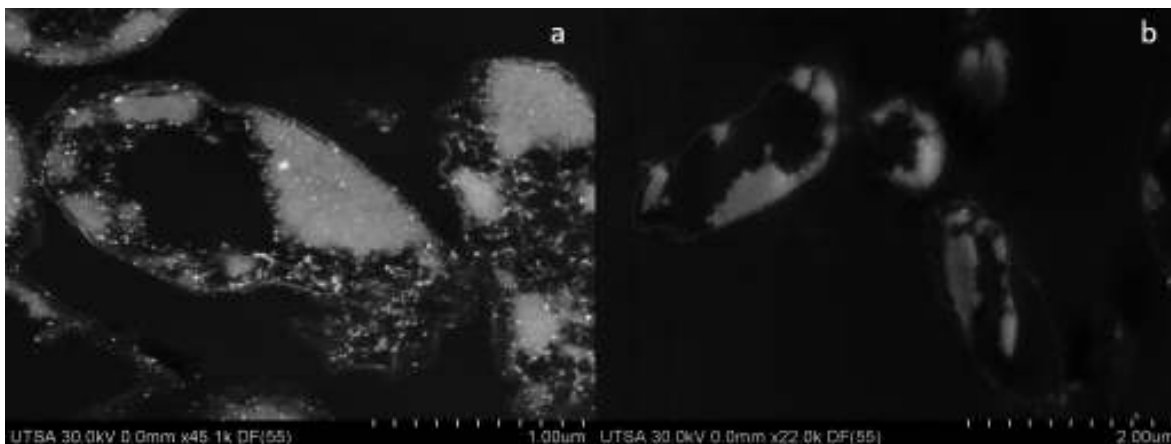


Figura 29. Cepas de la bacteria de *V. parahaemolyticus* tratadas con AgNPs sintetizadas con extracto de *R. hymenosepalus* observadas en campo oscuro (a) Bacterias con 100µg/ml de AgNps (b), Bacterias sin AgNps.

#### VI.4. Prueba de supervivencia de nauplios de *Artemia franciscana*

Las concentraciones que registraron mayor actividad inhibitoria contra la cepa de la bacteria de *V. parahaemolyticus*, tanto de AgNPs como del extracto puro de *R. hymenosepalus* en las pruebas de placas de 96 pozos *in vitro* (CMI), para su uso en las pruebas con nauplios de *Artemia* estas se duplicaron, esto fue, 45 y 50 µg/mL para nanopartículas de plata y de 220 y 240 µg/mL para el extracto puro. Se comprobó que los organismos consumieron los productos suministrados a través de observaciones periódicas de los mismos con un estereoscopio (Figura 30). Los nauplios de *Artemia* fueron analizados por microscopía confocal, donde se observó que la quitina que compone la mayoría de su cuerpo es fluorescente como se observa en la imagen de fluorescencia (Figura 31).

En un período de 18 horas se observó que la mayor parte de organismos presentaron el material en su intestino. La supervivencia para ambas concentraciones de AgNps fue ligeramente superior al 88%. Para ambas concentraciones del extracto puro tampoco hubo diferencias, con una supervivencia superior al 95%. No se encontró diferencia significativa entre los dos tratamientos ( $P < 0.05$ ) (Tabla 4).



Figura 30. Nauplios de *Artemia* donde se observa el material de prueba en su región intestinal. A las 18 horas de experimento se observó la mayoría de la población con material en su región intestinal.

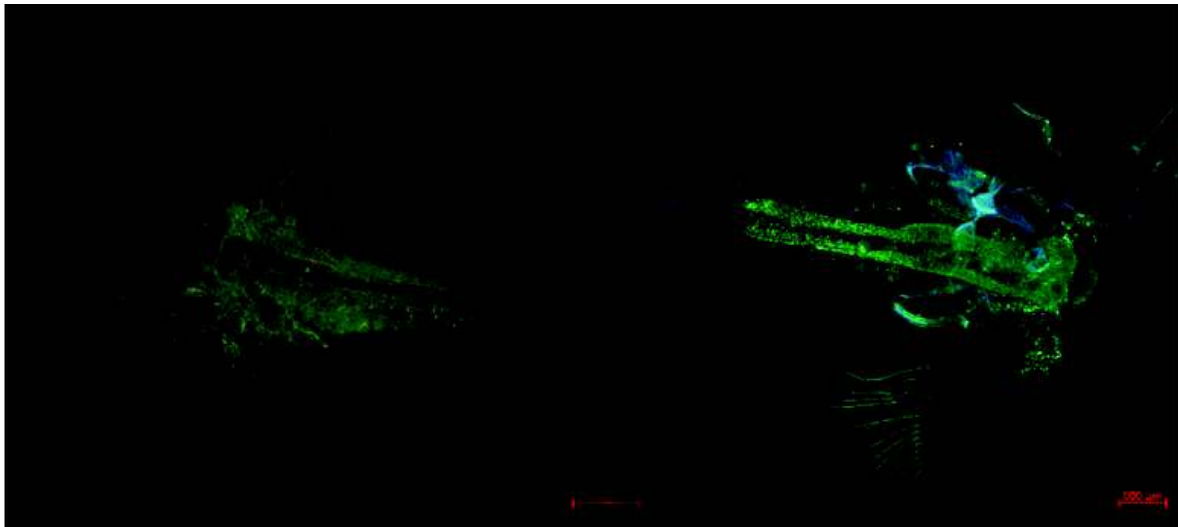


Figura 31. Nauplios de *Artemia* tratados observados bajo microscopía confocal en campo oscuro, se puede apreciar la fluorescencia debido a la quitina que compone su cuerpo.

Tabla 4. Resultados supervivencia de nauplios de *Artemia* en presencia de AgNps y extracto de *Rumex*.

Hora	Control	AgNPs 45 µg/mL	AgNps 50 µg/mL	<i>Rumex</i> <i>hymenosepalus</i> 220 µg/ml	<i>Rumex</i> <i>hymenosepalus</i> 240 µg/ml
0	100	100±0	100±0	100±0	100±0
6	100	89.7±2.2	97.1±2.5	100±0	100±0
12	100	88.4±0.4	93±2.7	100±0	98.76±2.1
18	100	88.4±0.4	91.4±2.2	98.6±2.3	98.7±2.1
24	100	88.4±0.4	91.4±2.2	97.3±4.6	97.5±4.2

## VI.5. Retos bacterianos experimentales con postlarvas de camarón

### VI.5.1. Reto bacteriano preventivo en postlarvas de camarón

En el experimento preventivo, primero se trataron las postlarvas con los elementos inhibidores y posteriormente se procedió a la infección de los organismos. En el tratamiento control donde se utilizó AgNps y el Extracto de *Rumex*, así como postlarvas sin elementos inhibitorios, todos sin infectar, se obtuvo un 100% de supervivencia, a excepción del control, que presentó una supervivencia de aproximadamente 95%. No se encontró diferencia significativa entre los tratamientos ( $P < 0.5$ ) (Figura 32).

Una vez que las postlarvas fueron tratadas con los inhibidores bacterianos se sometieron al reto de infección con *V. parahaemolyticus*. Los resultados del experimento se pueden observar en la Figura 33. Se registró una supervivencia para el tratamiento con extracto de *Rumex* de 92.1%, AgNps con 87.5% y para el control de 58.3% a las 24 h de experimentación. No se encontraron diferencias estadísticas entre los tratamientos de nanopartículas y *Rumex*, pero sí entre el tratamiento de *Rumex* y el control.

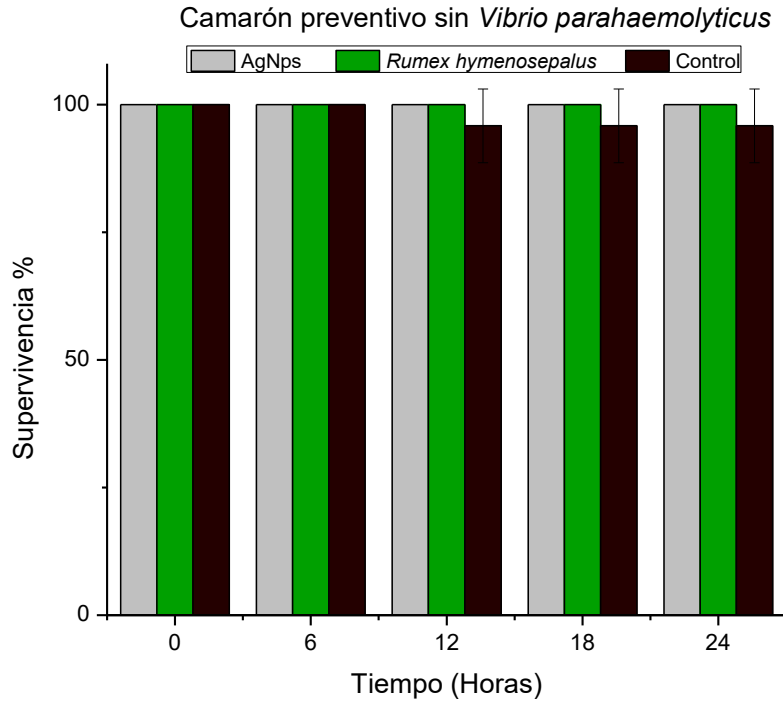


Figura 32. Supervivencia de postlarvas de camarón con tratamientos de AgNPs y extracto de *Rumex* y control sin infectar, durante 24 horas.

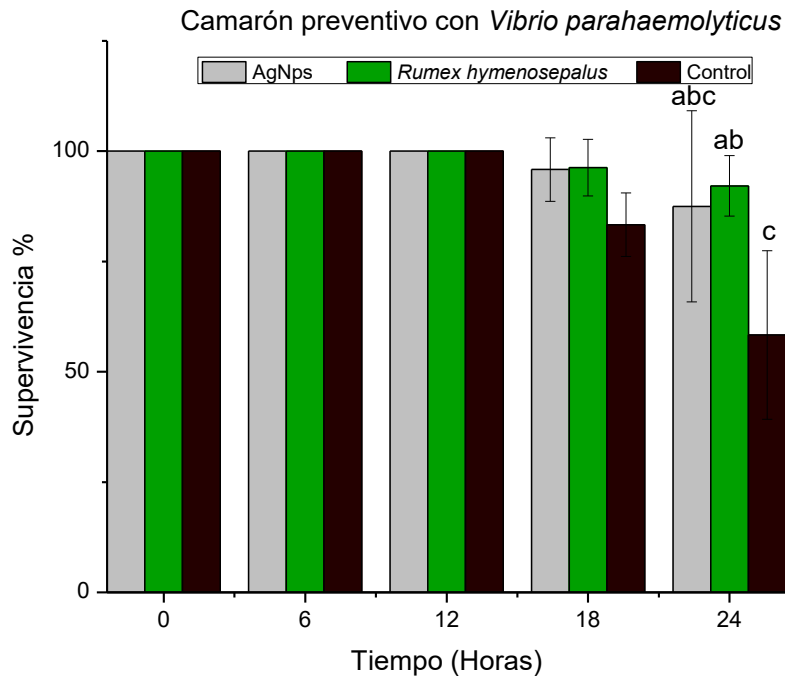


Figura 33. Supervivencia de postlarvas de camarón después 24 horas de infección con la bacteria *V. parahaemolyticus* con tratamientos previos de AgNPs, extracto de *Rumex* y control.

### VI.5.2. Reto bacteriano correctivo en postlarvas de camarón

En el experimento correctivo, las postlarvas fueron primeramente infectadas con la bacteria *V. parahemolyticus* y posteriormente alimentadas con nauplios de *Artemia* tratados previamente con AgNPs y extracto de *Rumex* por separado. El grupo control (sin tratamientos/sin infección) presentó una supervivencia del 100% (Figura 34).

Las postlarvas tratadas post infección con nauplios de *Artemia* alimentados con AgNPs, presentaron una supervivencia promedio de 87.5% a las 18 horas y 75% de supervivencia a las 24 horas; mientras que las que recibieron nauplios de *Artemia* con *Rumex*, alcanzaron una supervivencia promedio del 100%. El grupo control, que recibió nauplios de *Artemia* sin tratamiento, presentó una supervivencia promedio del 100% en las 24 horas del experimento (Figura 35). No se encontraron diferencias estadísticas ( $P < 0.05$ )

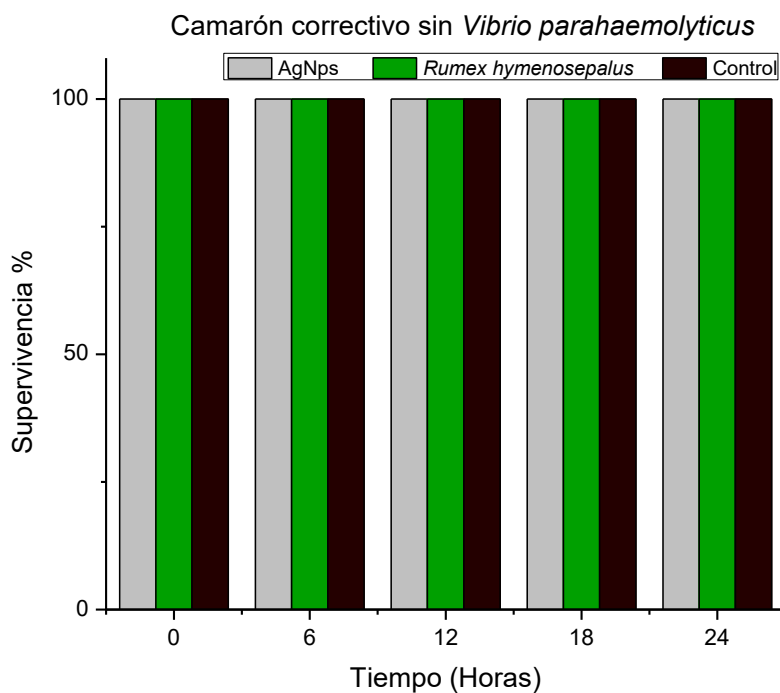


Figura 34. Supervivencia de postlarvas de camarón sin infección de *V. parahaemolyticus* con AgNPs, extracto de *Rumex* y control.

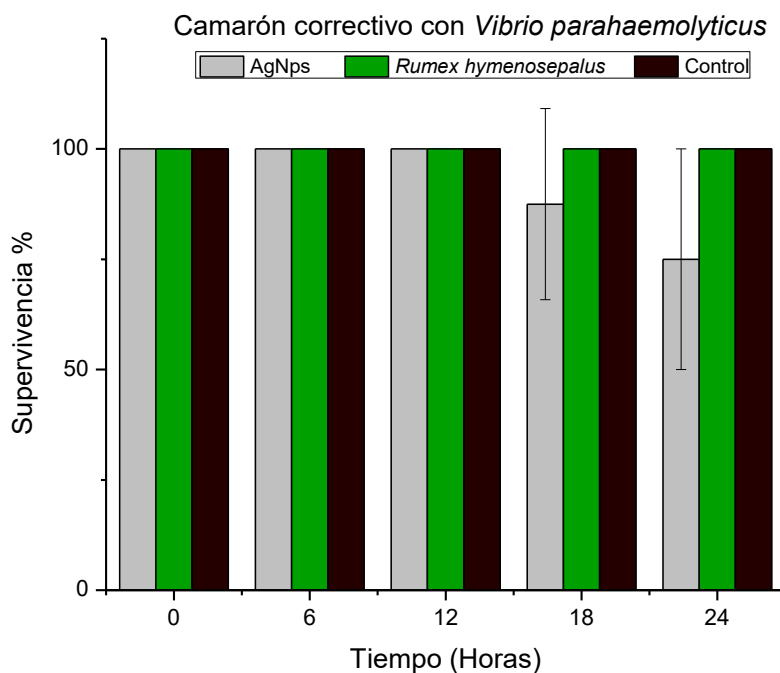


Figura 35. Supervivencia de camarón infectado con *V. parahaemolyticus* con AgNps, extracto de *Rumex* y control.

### VI.5.3. Observación de muestras de camarón por MET, MEB y espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDS)

De los organismos fijados con Glutraldehído al 4%, que fueron previamente tratados con nanopartículas e infectados con *V. parahaemolyticus*, se realizaron cortes finos por micrótopo de la región del hepatopáncreas e intestino. Estos cortes fueron preparados y sometidos al análisis por microscopía electrónica de transmisión (MET) y por espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDS).

En la mayoría de las muestras de tejidos analizadas por MET no se observaron nanopartículas de plata insertas en ellos. De la misma manera, el análisis por EDS no mostró la presencia del elemento plata.

Sin embargo, en una muestra de hepatopáncreas se pudo detectar la presencia de plata mediante EDS acoplado a un microscopio electrónico de barrido (Figura 35). En la figura se

pueden observar puntos verdes que indican el lugar donde se localiza el elemento plata, aunque se observó una baja presencia en el tejido. Para intentar localizar las nanopartículas de plata en el tejido anterior, se amplificó el área de interés de la muestra donde se detectó el elemento plata, utilizando un microscopio electrónico más potente (MET de alta resolución JEOL 2010F), sin embargo, no fue posible observar la presencia de nanopartículas de plata como tal.

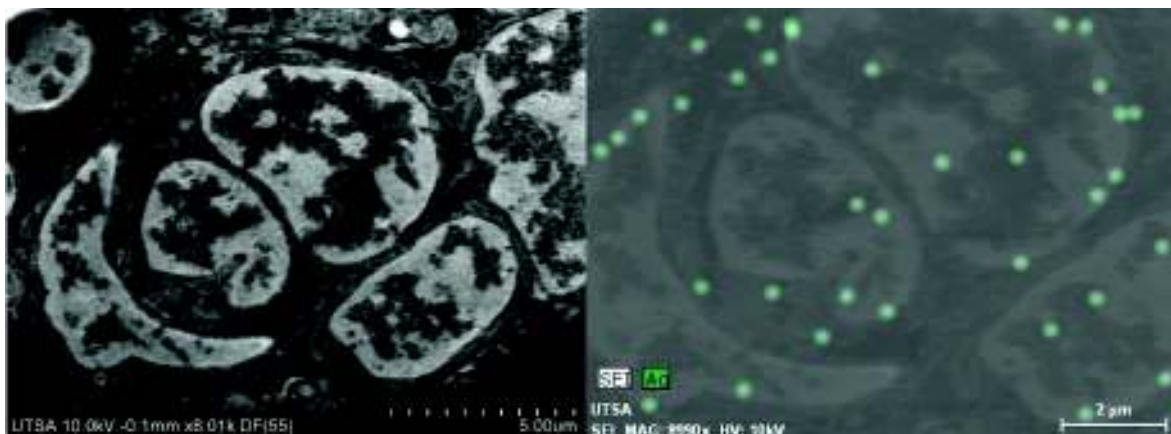


Figura 36. Corte de hepatopáncreas de camarón con nanopartículas e infectado con *V. parahaemolyticus* observado bajo microscopía electrónica de barrido y aplicando EDS. a) Área seleccionada donde se llevó acabo el EDS. b) Los puntos verdes indican la presencia del elemento plata en el tejido.



## VII. DISCUSIÓN

### VII.1. Extracto

El extracto de raíz de *R. hymenosepalus* adquirida comercialmente, se contrastó en el UV-Vis junto a *R. hymenosepalus* obtenida del medio silvestre en Imuris, Sonora para observar diferencias en las bandas de UV (Figura 19).

Ambas bandas presentan un similar comportamiento, pero se puede observar en la región de 300 a 350 nm de longitud de onda un ligero incremento en la banda de *Rumex* “fresca” o silvestre (Figura 19), la expresión de la banda puede estar asociada al compuesto t-resveratrol, un compuesto polifenólico, conocido por su capacidad antioxidante y actividades antimicrobianas, que su mayor pico se expresa de 305 a 330nm (Kolouchová *et al.*, 2004) y que pudo verse disminuido en la muestra comercial por efecto de manejo y almacenamiento.

### VII.2. Espectroscopía IR de Extracto de *R. hymenosepalus* y AgNPs

El espectro IR de las AgNPs es similar al IR del extracto de *R. hymenosepalus* (Figura 20), aún después de que las nanopartículas fueron sometidas a un protocolo de limpieza para remover el extracto excedente, lo cual confirma que las nanopartículas son estabilizadas por las moléculas polifenólicas que participan en la reducción de los iones de plata. En el espectro IR de las nanopartículas de plata el pico centrado alrededor de  $1650\text{cm}^{-1}$  es más intenso que en el extracto. Algunos autores reportan picos del grupo carbonilo (C=O) entre  $1620\text{cm}^{-1}$  y  $1690\text{cm}^{-1}$  (Satyavanni, 2011; Majumdar, 2013), de tal forma que este incremento en la intensidad de la señal puede ser atribuida a la presencia de quinonas generadas por la oxidación de las moléculas polifenólicas del extracto *Rumex* en la reacción de síntesis de las nanopartículas como se ilustra en la Figura 5.

El-Shahaby y colaboradores (2013), reportan la síntesis de nanopartículas de plata empleando extractos de *R. dentatus*. Las nanopartículas reportadas en este trabajo son de tamaños comprendidos entre 5nm y 30nm, además el máximo de la banda de absorción asociada a las nanopartículas de plata se ubica en 460nm a diferencia de los 415nm que obtenemos en nuestra síntesis, lo cual confirma que nuestras nanopartículas poseen tamaños más pequeños

(2nm-10nm). Lo anterior puede deberse a los tipo de compuestos presentes en los respectivos extractos, pues en el caso de la *R. hymenosepalus*, cuyos extractos son obtenidos de la raíz de la planta, las principales moléculas antioxidantes reportadas son catequinas (EC, ECG y EGCG) y estilbenos (t-resveratrol glicosado) (Rodríguez *et al.*, 2013), mientras que en el caso de la *R. dentatus*, el extracto empleado por El-Shahaby y colaboradores, proviene de la parte aérea de la planta donde sobresalen los compuestos fenólicos reportados en la Figura 37 y en los cuales los grupos hidroxilos potencialmente reductores, no son tan abundantes como en el caso de las catequinas cuyas estructuras químicas se muestran en la Figura 38.

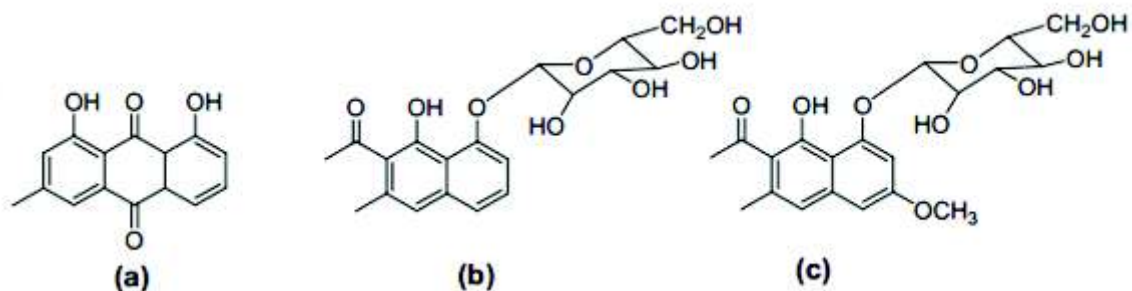


Figura 37. Estructura química de los tres principales compuestos fenólicos en el extracto de la parte aérea de *R. dentatus* (El-Shahaby *et al.*, 2013).

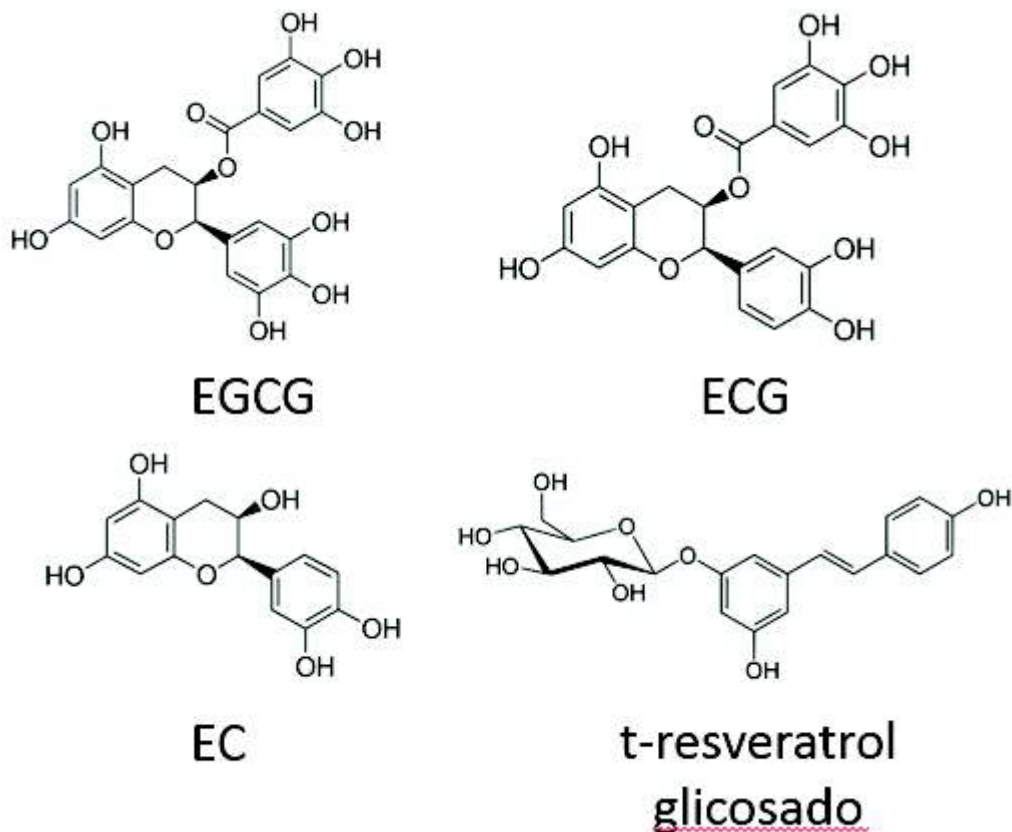


Figura 38. Compuestos polifenólicos más abundantes en el extracto de *R. hymenosepalus*, Epigallocatequina galato (EGCG), epicatequina galato (ECG), epicatequina (EC) y t-resveratrol glicosado (Rodríguez *et al.*, 2013).

La Figura 39 muestra el espectro Infra-Rojo correspondiente a los extractos de *R. hymenosepalus* y *R. dentatus* donde puede apreciarse la presencia de las mismas bandas pues los grupos fenólicos característicos en cada extracto presentan los mismos enlaces químicos y grupos característicos (-OH, C-H, C=O, C-O-C). En particular sobresale una absorción más intensa en el extracto de *R. dentatus* cercano a los 1640-1650  $\text{cm}^{-1}$ ; lo anterior coincide con lo reportado por Kota *et al.* 2017, quienes reportan una banda intensa centrada en 1637  $\text{cm}^{-1}$  para un extracto acuso de hojas de *R. acetosa* la cual atribuyen a flexiones del enlace N-H lo cual puede asociarse a la presencia de proteínas en los extractos de hojas y ausentes en el caso del extracto de raíz la *R. hymenosepalus*.

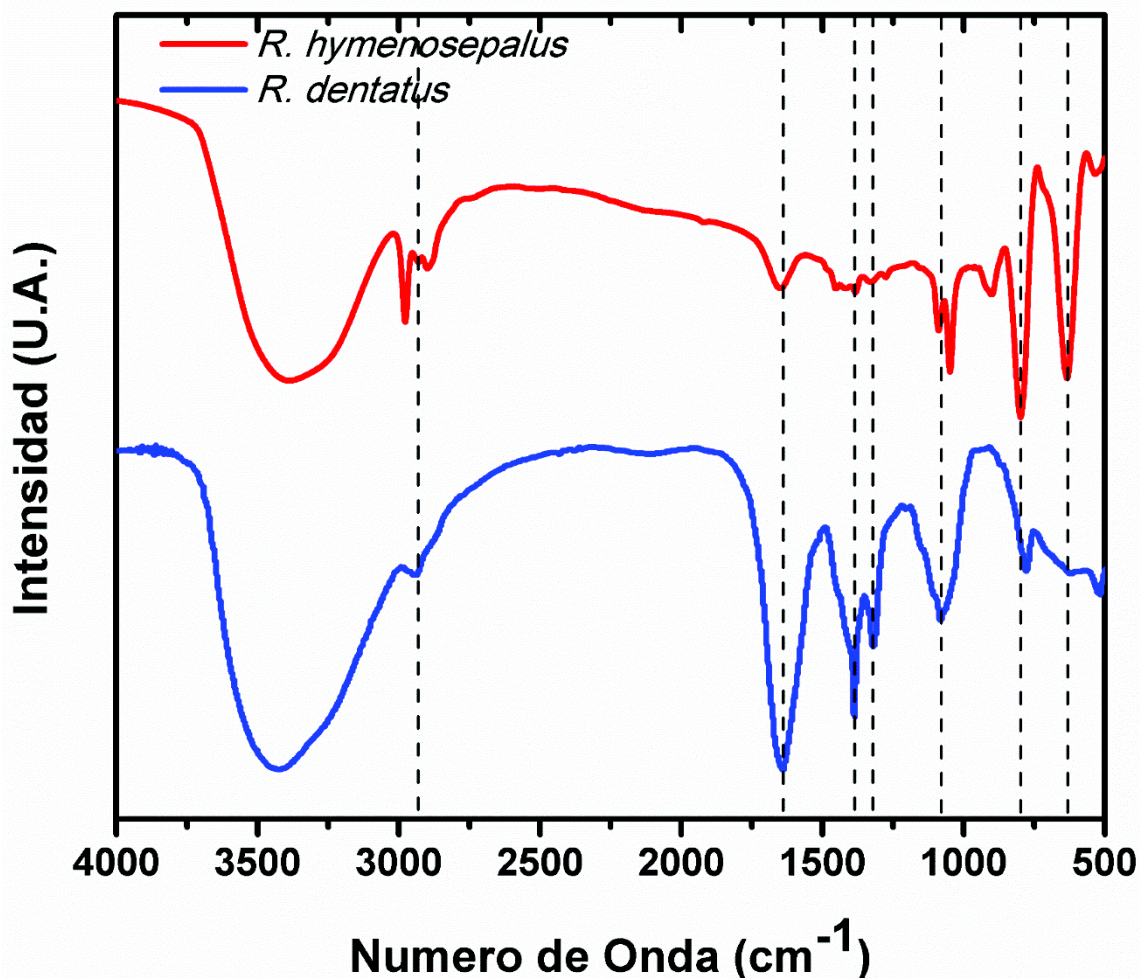


Figura 39. Comparación IR de *R. hymenosepalus* y *R. dentatus*. (Figura modificada de El-Shahaby *et al.*, 2013; Rodríguez *et al.*, 2013)

### VII.3. Síntesis de nanopartículas

Las partículas de plata sintetizadas con el extracto de *R. hymenosepalus* son de los tamaños apropiados para lograr un efecto bactericida notable, pues de acuerdo con Agnihotri *et al.* (2014), se requieren nanopartículas menores a 15 nm para lograr la inhibición bacteriana. En particular, recientemente se ha demostrado que el sistema de nanopartículas de plata obtenidas con extractos de *Rumex* presentan efectos inhibitorios en bacterias gram positivas y negativas (Rodríguez *et al.*, 2017); además se demostró que la nanopartícula forma en realidad un sistema compuesto extracto-nanopartícula. Este hecho parece evidenciarse en nuestro caso como lo muestra la micrografía 26, donde se observa a las nanopartículas inmersas en una matriz que

aparentemente corresponde al extracto de *R. hymenosepalus*. Lo anterior respaldan los resultados de espectroscopía UV-Vis e IR, donde el sistema de nanopartículas presentó, aún después de someterse a un proceso de limpieza, señales correspondientes al extracto, por lo que podemos establecer que también en este caso las nanopartículas se encuentran acomplejadas al extracto de *Rumex*, lo que favorece la estabilidad del sistema (Figura 26) al formar un composito nanopartícula-extracto, lo que puede mejorar la sinergia de la actividad bactericida.

#### **VII.4. Inhibición bacteriana**

Las nanopartículas de plata que se sintetizaron a base del extracto *R. hymenosepalus*, junto con el extracto de la planta presentaron capacidad inhibitoria bacteriana. Aun cuando en la mayoría de los estudios se reportan ensayos por difusión de disco o el ensayo de pocillo en pruebas antimicrobianas (Kumar *et al.*, 2012). Al inicio de este trabajo se intentó realizar la CMI mediante ensayo de pocillo, pero el uso de lector de placas presentó una mayor sensibilidad a la actividad que tienen las diferentes concentraciones de los agentes utilizados, es por lo tanto que se decidió utilizar este estudio para determinar la concentración mínima bactericida. En el 2017 Palanisamy y colaboradores probaron nanopartículas de plata sintetizadas con extracto de *Spirulina* para control de *Vibrio parahaemolyticus* y realizaron las pruebas de inhibición por el método del pocillo, encontraron que la concentración de nanopartículas correspondientes a 25µg/mL, 50µg/mL y 75µg/ml presentaron el mismo halo de inhibición, sin diferencia entre ellas. Así mismo, el extracto de la planta *Spirulina* usada para sintetizar las nanopartículas no presentó inhibición sobre *V. parahaemolyticus*.

Vaseeharan *et al.* (2010), probaron distintas concentraciones de nanopartículas de plata contra *Vibrio harveyi*, y encontraron que a 35µg/mL no hubo crecimiento de la bacteria. Este valor es superior al encontrado en nuestro estudio de 25µg/ml (Figura 27).

#### **VII.5. Toxicidad sobre nauplios de *Artemia franciscana***

En la literatura revisada no se encontraron registros del uso de nauplios de *Artemia* como vector de nanopartículas, aun así, existen trabajos donde se ha utilizado como modelo para evaluar la toxicidad de nanomateriales. Wang *et al.* (2017), evaluaron la toxicidad de nanopartículas  $\alpha$ -

Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> en *Artemia salina* (Figura 40), Ellos reportaron mortalidades del 20% a una concentración de 50mg/L, similares a las encontradas en nuestro trabajo con el 10% de mortalidad a las 24 horas de la prueba de toxicidad de *Artemia* con 50µg/mL.

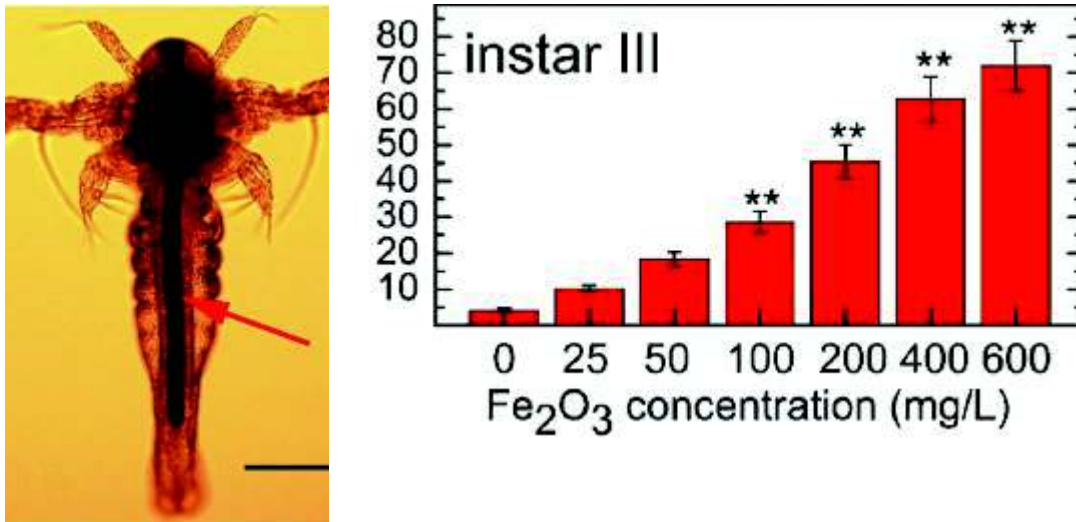


Figura 40. *Artemia* con intestino lleno (izquierda) y tasa de mortalidad en base a concentración de nanopartículas (derecha).

En el trabajo de Latha *et al.* 2016, se evaluó la toxicidad y efectividad de nanopartículas de plata sintetizadas con *Adathoda vasica*, poniendo a prueba *Artemia* contra la bacteria *V. parahaemolyticus*, los autores reportaron que en sus resultados a las 24 h en el caso de las nanopartículas (50 mg/mL) presentaron una sobrevivencia debajo de 75% en artemias.

## VII.6. Retos bacterianos experimentales con postlarvas de camarón

### VII.6.1. Retos bacterianos preventivo y correctivo en postlarvas de camarón

Este trabajo es un primer intento para transferir nanopartículas hacia larvas de camarón por medio de nauplios de *Artemia*, lo que representa una aproximación sin antecedente. Existen trabajos con otras especies de camarón y de tallas más grandes como el reportado por Vaseeharan *et al.* en el 2010, quienes sintetizaron nanopartículas de plata con extracto de hojas

de té como agente reductor y utilizaron los nanomateriales para controlar la vibriosis causada por *V. harveyi*. Con concentraciones bacterianas iguales a las nuestras, probaron 5 y 10 µg/ml de AgNps y registraron una mortalidad >50% durante las primeras 14 horas después del tratamiento de nanopartícula.

Nuestro experimento se realizó alimentando al camarón el mismo día con artemia que acarrea nanopartículas de plata y *Rumex* previo (preventivo) y posterior a la infección (correctivo) con *V. parahaemolyticus*. En nuestro estudio de 24 horas no existió mortalidad hasta las 18 horas de infectado el camarón. Esto puede deberse a que las propiedades de las nanopartículas sintetizadas por el citado trabajo sean diferentes al nuestro; sin embargo, es importante considerar que el organismo hospedero y el patógeno eran de especies diferentes a las utilizadas en este trabajo.

Acedo y colaboradores publicaron en el 2017 un trabajo donde probaron el efecto de nanopartículas de plata que fueron sintetizadas usando como agentes reductores la planta de té verde (*Camellia sinensis*) combinada con hojas de árbol de neem (*Azadirachta indica*); Evaluaron el uso de sus AgNps contra la hepatopancreatitis necrotizante en *L. vannamei*, probaron concentraciones de 5 y 35µg/ml de nanopartículas de plata, siendo la de mayor concentración última donde reportaron una sobrevivencia de 100%.

#### VII.6.2. Observación de muestras de camarón MET, MEB y espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDS)

Con el desarrollo de los nanomateriales y su uso en sistemas biológicos, la microscopía electrónica se ha aplicado para observar la interacción de los nanomateriales con tejidos biológicos. Para ello como en la preparación de muestra de tejido biológico para MET se muestra, es necesario que se prepare en inicio la muestra biológica en una resina que la haga compatible con el alto vacío del microscopio y a su vez es necesario teñir los orgánulos celulares para que sea posible observarlos bajo MET.

Al momento de observar los tejidos por microscopía electrónica de barrido, se observaron elementos con características semejantes a las AgNPs, al desprender un brillo o un punto blanco (Figura 41) sin embargo, al realizar el análisis mediante EDS solo dio como resultado la

presencia del elemento osmio. Este elemento forma parte del compuesto tetraóxido de Osmio ( $\text{OsO}_4$ ), utilizado para teñir las muestras durante la preparación para MET.

EL osmio tiende a reaccionar con enlaces dobles  $\text{C}=\text{C}$ , esto quiere decir que actúa sobre lípidos insaturados, y diversos grupos funcionales que tienen las proteínas, por lo tanto, logra ingresar intramolecularmente entre proteínas y lípidos insaturados. Sumándose la capacidad de oxidar plata metálica y por lo tanto acelera la disolución de la plata, disgregando la nanopartícula de plata y provocando la creación de “artefactos” que se forman durante los métodos de preparación de muestras biológicas que tuvieron interacción con nanopartículas de plata (Chen, 2016). Se debe considerar que la búsqueda de nanopartículas de plata en el tejido del camarón no era el objetivo principal del proyecto y la concentración administrada tal vez es muy baja para que logre ser detectada en el organismo. También se debe considerar que los cortes realizados y observados al final son de 90nm, si buscamos en un cuadro de tejido de 2mm x 2mm, siendo estos  $4\text{mm}^2$ , se está hablando de  $4\,000\,000\,000\,000\text{nm}^2$  de los cuales realizamos un corte de un grosor de 90nm.

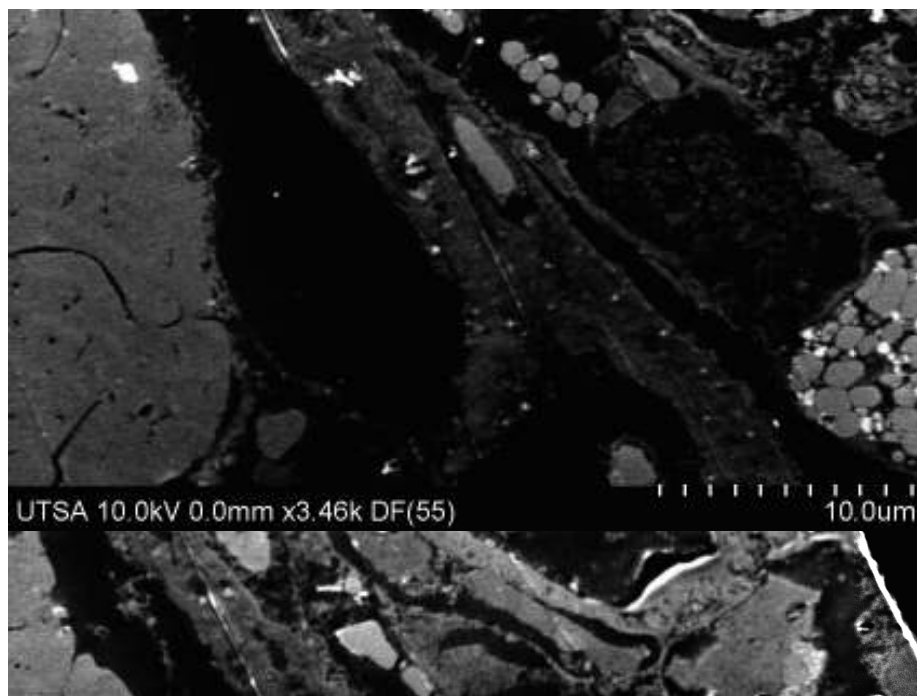


Figura 41. Corte ultrafino (80nm) de intestino de camarón tratado con AgNps visto bajo MEB con puntos brillantes o blancos que pueden dar falsos positivos de AgNps.



## **VIII. CONCLUSIONES**

### **VIII.1. Extracto**

La obtención del extracto fue exitosa, y aun cuando para esta investigación se utilizó *Rumex hymenosepalus* obtenida comercialmente, el UV-VIS nos mostró que no cambia mucho en comparación al extracto de *R. hymenosepalus* obtenida fresca en el campo.

### **VIII.2. Síntesis de nanopartículas**

La síntesis de nanopartículas de plata utilizando *Rumex hymenosepalus* es posible, y las nanopartículas que se obtienen como producto se encuentran entre los tamaños deseados.

### **VIII.3. Inhibición bacteriana**

La evaluación *in vitro* de la efectividad de las nanopartículas de plata y del extracto de *Rumex hymenosepalus* nos pudo confirmar que la concentración misma inhibitoria de las nanopartículas de plata era alrededor de 25 µg/ml, siendo concentraciones menores a esta no fueron efectivas contra el crecimiento de la bacteria, a su vez se observó que la concentración del extracto de *Rumex hymenosepalus* recorría la fase lag de la bacteria conforme el aumento de esta.

### **VIII.4. Toxicidad y acarreamiento *Artemia franciscana***

La *Artemia franciscana* mostró tolerancia a las nanopartículas de plata y extracto de *R. hymenosepalus* al presentar alta sobrevivencia; de igual manera, funcionó como vector de las nanopartículas y el extracto de *R. hymenosepalus* para llevar los tratamientos al camarón blanco. Por lo que se puede considerar como buen vector para llevar el nanomaterial a los organismos.

### **VIII.5. Evaluar los efectos inhibitorios de las nanopartículas de plata y *R. hymenosepalus* sobre camarones infectados con *V. parahaemolyticus***

En los camarones tanto preventivo y correctivo que se les administro el tratamiento y no fueron infectados por *Vibrio parahaemolyticus*, se registró una supervivencia completa 100%, bajando un poco en el control de la preventiva. En cambio, en el experimento preventivo los camarones que fueron infectados, si presentaron a las 24 horas una baja en la supervivencia en el caso de los que fueron tratados con nanopartículas de plata, extracto de *Rumex* y el control. Presentando el control la mayor baja en la supervivencia, seguida de las nanopartículas, para dejar al extracto de *Rumex* como el tratamiento que registro mayor sobrevivencia en el experimento preventivo. A su vez, al realizar un análisis ANOVA y un test de Tukey presentó diferencias significativas entre el extracto y el control.

En el caso del experimento correctivo de 24 horas, solo se registró una baja en la sobrevivencia en los camarones tratados con nanopartículas de plata.

Se buscó la presencia de nanopartículas de plata en tejido de camarón mediante microscopía electrónica de transmisión, microscopía electrónica de barrio y realizando EDS, aun cuando el EDS mostraba presencia de plata, no fue posible detectar nanopartículas de plata en el camarón mediante microscopía.

## IX.RECOMENDACIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo y con la finalidad de mejorar trabajos posteriores, se superen las siguientes recomendaciones:

- Realizar estudios para aislar y purificar los compuestos en el extracto de *Rumex hymenosepalus*, determinar los compuestos en el extracto que tienen efecto bactericida y que son los principales agentes reductores que intervienen en la formación de las nanopartículas.
- Realizar un estudio comparativo con *Rumex hymenosepalus* silvestre para utilizarlo como reductor en la síntesis de AgNps y caracterizarla mediante MET y comparar también su efecto microbicida.
- Realizar análisis de biología molecular para evaluar expresión de genes específicos en bacterias, artemia y camarones.
- Contrastar la actividad de las nanopartículas de plata sintetizadas con *Rumex* contra nanopartículas comerciales y nitrato de plata.
- Realizar los bioensayos en camarones de diferentes tallas.

## X. LITERATURA CITADA

- Acedo-Valdez, M. R., Grijalva-Chon, J. M., Larios-Rodríguez, E., Maldonado-Arce, A. D., Mendoza-Cano, F., Sánchez-Paz, J. A., & Castro-Longoria, R. (2017). Antibacterial effect of biosynthesized silver nanoparticles in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) infected with necrotizing hepatopancreatitis bacterium (NHP-B). *Latin american journal of aquatic research*, 45(2), 421-430.
- Agnihotri, S., Mukherji, S., y Mukherji, S. 2014. Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. *RSC Advances*, 4:3974-3983.
- Ates, M., Demir, V., Arslan, Z., Camas, M., & Celik, F. (2016). Toxicity of engineered nickel oxide and cobalt oxide nanoparticles to *Artemia salina* in seawater. *Water, Air, & Soil Pollution*, 227(3), 70.
- Baumann, O. (1984). Family II. Vibrionaceae. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1, 516-550.
- Canesi, L., Ciacci, C., Fabbri, R., Marcomini, A., Pojana, G., & Gallo, G. (2012). Bivalve molluscs as a unique target group for nanoparticle toxicity. *Marine Environmental Research*, 76, 16-21.
- Chen, S., Goode, A. E., Skepper, J. N., Thorley, A. J., Seiffert, J. M., Chung, K. F., & Porter, A. E. (2016). Avoiding artefacts during electron microscopy of silver nanomaterials exposed to biological environments. *Journal of microscopy*, 261(2), 157-166.
- Cuéllar-Anjel, J. (2012). Síndrome de Mortalidad Temprana (EMS). In *Memorias de la Conferencia técnica presentada a miembros de la OIE, Ministerio de Desarrollo Agropecuario de Panamá (MIDA–DINASA) y sector privado camarero panameño. Estación de Aguas Estuarinas Ing. Enrique Enseñat, Aguadulce (Coclé), Panamá*
- Cuéllar-Anjel, J., Lara, C., Morales, V., De Gracia, A., & García Suárez, O. (2010). Manual de buenas prácticas de manejo para el cultivo del camarón blanco *Penaeus vannamei*.
- CONAPESCA (2013). Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca 2013.
- Del Mar, Y. A., y De Grado, T. F. Toxicidad de Nanopartículas sobre Organismos Acuáticos – Tesis-
- FAO 2006-2017. Programa de información de especies acuáticas. *Penaeus vannamei*. Programa de información de especies acuáticas. Texto de Briggs, M. In: Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO [en línea]. Roma. Actualizado 7 April 2006. [Citado 29 August 2017].

- Ferreres, F., Ribeiro, V., Izquierdo, A. G., Rodrigues, M. Â., Seabra, R. M., Andrade, P. B., y Valentão, P. (2006). *Rumex induratus* leaves: interesting dietary source of potential bioactive compounds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(16), 5782-5789.
- Franci, G., Falanga, A., Galdiero, S., Palomba, L., Rai, M., Morelli, G., & Galdiero, M. (2015). Silver nanoparticles as potential antibacterial agents. *Molecules*, 20(5), 8856-8874.
- El-Shahaby, O., El-Zayat, M., Salih, E., El-Sherbiny, I. M., & Reicha, F. M. (2013). Evaluation of antimicrobial activity of water infusion plant-mediated silver nanoparticles. *J Nanomed Nanotechol*, 4, 178.
- García-Barrasa, J., López-de-Luzuriaga, J. M., & Monge, M. (2011). Silver nanoparticles: synthesis through chemical methods in solution and biomedical applications. *Central European journal of chemistry*, 9(1), 7-19
- Grimaldi, A. M., Belcari, P., Pagano, E., Cacialli, F., & Locatello, L. (2013). Immune responses of *Octopus vulgaris* (Mollusca: Cephalopoda) exposed to titanium dioxide nanoparticles. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 447, 123-127.
- He, S., Guo, Z., Zhang, Y., Zhang, S., Wang, J., & Gu, N. (2007). Biosynthesis of gold nanoparticles using the bacteria *Rhodospseudomonas capsulata*. *Materials Letters*, 61(18), 3984-3987.
- Heuer, O. E., Kruse, H., Grave, K., Collignon, P., Karunasagar, I., & Angulo, F. J. (2009). Human health consequences of use of antimicrobial agents in aquaculture. *Clinical Infectious Diseases*, 49(8), 1248-1253.
- Informe Final COSAES 2014 Seguimiento a los cultivos de camarón del estado de Sonora - Comité de Sanidad Acuícola del Estado de Sonora.
- Iravani, S. (2011). Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chemistry*, 13(10), 2638-2650.
- Juárez-Moreno, K., Mejía-Ruiz, C. H., Díaz, F., Reyna-Verdugo, H., Re, A. D., Vazquez-Felix, E. F., & Bogdanchikova, N. (2017). Effect of silver nanoparticles on the metabolic rate, hematological response, and survival of juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Chemosphere*, 169, 716-724
- Kandasamy, K., Alikunhi, N. M., Manickaswami, G., Nabikhan, A., & Ayyavu, G. (2013). Synthesis of silver nanoparticles by coastal plant *Prosopis chilensis* (L.) and their efficacy in controlling vibriosis in shrimp *Penaeus monodon*. *Applied Nanoscience*, 3(1), 65-73.
- Klasen, H. J. (2000). A historical review of the use of silver in the treatment of burns. II. Renewed interest for silver. *Burns*, 26(2), 131-138.

- Kolouchová-Hanzlíková, I., Melzoch, K., Filip, V., & Šmidrkal, J. (2004). Rapid method for resveratrol determination by HPLC with electrochemical and UV detections in wines. *Food Chemistry*, *87*(1), 151-158.
- Kota, S., Dumpala, P., Anantha, R. K., Verma, M. K., & Kandepu, S. (2017). Evaluation of therapeutic potential of the silver/silver chloride nanoparticles synthesized with the aqueous leaf extract of *Rumex acetosa*. *Scientific Reports*, *7*.
- Krochmal, A., y Paur, S. 1951. Canaigre—A desert source of tannin. *Economic Botany*, *5*:367-377.
- Kumar, D., Roy, R., Parashar, A., Raichur, A. M., Chandrasekaran, N., Mukherjee, A., & Mukherjee, A. (2017). Toxicity assessment of zero valent iron nanoparticles on *Artemia salina*. *Environmental toxicology*, *32*(5), 1617-1627.
- Kumar, P., Selvi, S. S., Praba, A. L., Selvaraj, M., Rani, L. M., Suganthi, P., & Govindaraju, M. (2012). Antibacterial activity and in-vitro cytotoxicity assay against brine shrimp using silver nanoparticles synthesized from *Sargassum ilicifolium*. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, *7*(4), 1447-1455.
- FAO (2016). El estado mundial de la pesca y la acuicultura.
- Latha, M., Priyanka, M., Rajasekar, P., Manikandan, R., & Prabhu, N. M. (2016). Biocompatibility and antibacterial activity of the *Adathoda vasica* Linn extract mediated silver nanoparticles. *Microbial pathogenesis*, *93*, 88-94.
- Lee, C. T., Chen, I. T., Yang, Y. T., Ko, T. P., Huang, Y. T., Huang, J. Y., ... & Lightner, D. V. (2015). The opportunistic marine pathogen *Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(34), 10798-10803.
- Lightner, D. V., Redman, R. M., Pantoja, C. R., Noble, B. L., & Tran, L. (2012). Early mortality syndrome affects shrimp in Asia. *Global Aquaculture Advocate*, *15*(1), 40.
- López-León, P., Luna-González, A., Escamilla-Montes, R., del Carmen Flores-Miranda, M., Fierro-Coronado, J. A., Álvarez-Ruiz, P., & Diarte-Plata, G. (2016). Isolation and characterization of infectious *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of AHPND, from the whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Latin American Journal of Aquatic Research*, *44*(3), 470.
- Majumdar, R., Bag, B. G., & Maity, N. (2013). *Acacia nilotica* (Babool) leaf extract mediated size-controlled rapid synthesis of gold nanoparticles and study of its catalytic activity. *International Nano Letters*, *3*(1), 53.
- Martínez-Córdova, L. R., Martínez Porchas, M., & Cortés-Jacinto, E. 2009. Camaronicultura mexicana y mundial: ¿actividad sustentable o industria contaminante?. *Revista internacional de contaminación ambiental*, *25*(3), 181-196.

- Morales, V. (1990). Levantamiento larvario de camarones peneidos. Programa Regional de Apoyo al Desarrollo de la Pesca en el Istmo Centroamericano, Panamá (Panamá).
- Palma, C., & Antonio, K. (2014). Evaluación de la sobrevivencia de las post larvas de camarón *Litopenaeus vannamei* en diferentes procesos de recepción, transporte y siembra. (Bachelor's thesis, Machala: Universidad Técnica de Machala).
- Palanisamy, S., Anjali, R., Rajasekar, P., Kannapiran, E., Vaseeharan, B., & Prabhu, N. M. (2017). Synthesis and Distribution of Bioinspired Silver Nanoparticles Using Spirulina Extract for Control of *Vibrio parahaemolyticus* Infection in Aquaculture. *Asian Journal of Chemistry*, 29(4), 857.
- Pickering, A. D., & Pottinger, T. G. (1989). Stress responses and disease resistance in salmonid fish: effects of chronic elevation of plasma cortisol. *Fish physiology and biochemistry*, 7(1), 253-258.
- Rai, M., Yadav, A., & Gade, A. (2009). Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology advances*, 27(1), 76-83.
- Rajan, M. R., Archana, J., Ramesh, R., & Keerthika, V. (2017). The present study deals with the toxicity zinc oxide nanoparticles in tilapia *Oreochromis mossambicus*. zinc oxide nanoparticles were synthesized by chemical precipitation method and characterized using SEM, EDAX, FTIR and XRD. Toxicity tests were conducted. *PARIPEX-Indian Journal of Research*, 5(10).
- Rao, K. N. V., et al. (2011). "A study on the nutraceuticals from the genus *Rumex*."
- Rivero-Cruz, I., Acevedo, L., Guerrero, J. A., Martínez, S., Pereda-Miranda, R., Mata, R., ... y Timmermann, B. N. (2005). Antimycobacterial agents from selected Mexican medicinal plants. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 57:1117-1126.
- Rodríguez-León, E., Iñiguez-Palomares, R., Navarro, R. E., Herrera-Urbina, R., Tánori, J., Iñiguez-Palomares, C., & Maldonado, A. (2013). Synthesis of silver nanoparticles using reducing agents obtained from natural sources (*Rumex hymenosepalus* extracts). *Nanoscale Research Letters*, 8(1), 318.
- Rodríguez-León, E., Iñiguez-Palomares, R. A., Navarro, R. E., Rodríguez-Beas, C., Larios-Rodríguez, E., Alvarez-Cirerol, F. J., & Galván-Moroyoqui, J. M. (2017). Silver nanoparticles synthesized with *Rumex hymenosepalus* extracts: effective broad-spectrum microbicidal agents and cytotoxicity study. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 1-13.
- Romero, J., Feijoó, C. G., & Navarrete, P. (2012). Antibiotics in aquaculture—use, abuse and alternatives. In *Health and Environment in Aquaculture*. InTech.

- Satyavani, K., Gurudeeban, S., Ramanathan, T., & Balasubramanian, T. (2011). Biomedical potential of silver nanoparticles synthesized from calli cells of *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad. *Journal of nanobiotechnology*, 9(1), 43.
- Schrand, A. M., Schlager, J. J., Dai, L., & Hussain, S. M. (2010). Preparation of cells for assessing ultrastructural localization of nanoparticles with transmission electron microscopy. *nature protocols*, 5(4), 744.
- Shahverdi, A. R., Fakhimi, A., Shahverdi, H. R., & Minaian, S. (2007). Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 3(2), 168-171.
- Sesteaga, C. (1987). *Evaluación de calidad del extracto tánico de la cañagria (Rumex himenosepalus) mediante pruebas de curtido* (No. Folleto 950).
- Smith, P., Hiney, M. P., & Samuelsen, O. B. (1994). Bacterial resistance to antimicrobial agents used in fish farming: a critical evaluation of method and meaning. *Annual review of fish diseases*, 4, 273-313.
- Sondi, I., & Salopek-Sondi, B. (2004). Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of colloid and interface science*, 275(1), 177-182.
- Sorgeloos, P., Lavens, P., Léger, P. H., Tackaert, W., & Versichele, D. (1986). FAO Manual for the culture of brine shrimp *Artemia* in aquaculture. *Univ. Ghent*.
- Srinivasan, V., Bhavan, P. S., Rajkumar, G., Satgurunathan, T., & Muralisankar, T. (2017). Dietary Supplementation of Magnesium Oxide (MgO) Nanoparticles for Better Survival and Growth of the Freshwater Prawn *Macrobrachium rosenbergii* Post-larvae. *Biological trace element research*, 177(1), 196-208.
- Su, Y. C., & Liu, C. (2007). *Vibrio parahaemolyticus*: a concern of seafood safety. *Food microbiology*, 24(6), 549-558.
- Thammasorn, T., Somchai, P., Laosutthipong, C., Jitrakorn, S., Wongtripop, S., Thitamadee, S., & Saksmerprom, V. (2013). Therapeutic effect of *Artemia* enriched with *Escherichia coli* expressing double-stranded RNA in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Antiviral research*, 100(1), 202-206.
- Tu, H. T., Silvestre, F., Phuong, N. T., & Kestemont, P. (2010). Effects of pesticides and antibiotics on penaeid shrimp with special emphases on behavioral and biomarker responses. *Environmental toxicology and chemistry*, 29(4), 929-938.
- VanderJagt, T. J., Ghattas, R., VanderJagt, D. J., Crossey, M., & Glew, R. H. 2002. Comparison of the total antioxidant content of 30 widely used medicinal plants of New Mexico. *Life Sciences*, 70:1035-1040.



- Varela-Mejías, A., Peña-Navarro, N., & Aranguren-Caro, L. F. (2017). Necrosis aguda del hepatopáncreas: una revisión de la enfermedad en *Penaeus vannamei*.
- Voelcker, R. F. G. ( ). Raíz del Indica. *Am. Jour. Pharmacy* 58: 115. 1886.
- Wang, C., Jia, H., Zhu, L., Zhang, H., & Wang, Y. (2017). Toxicity of  $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles to *Artemia salina* cysts and three stages of larvae. *Science of the Total Environment*, 598, 847-855.
- Whitesides, G. M. (2005). Nanoscience, nanotechnology, and chemistry. *Small*, 1(2), 172-179
- Wu, H., He, L., Gao, M., Gao, S., Liao, X., & Shi, B. (2011). One-step *in situ* assembly of size-controlled silver nanoparticles on polyphenol-grafted collagen fiber with enhanced antibacterial properties. *New Journal of Chemistry*, 35(12), 2902-2909.
- Zhang, C., Hu, Z., & Deng, B. (2016). Silver nanoparticles in aquatic environments: Physiochemical behavior and antimicrobial mechanisms. *Water research*, 88, 403-427.

## Anexo 1

### Protocolo de obtención de extracto de *Rumex hymenosepalus* (completa)

1. Se obtiene de manera comercial raíz de *Rumex hymenosepalus*.
2. Las rodajas de raíz fueron cortadas de aproximadamente 0.5 cm de espesos con diámetros de 1 a 2 cm.
3. Se depositó 15 g de rodajas en 1000 ml de una mezcla etanol/agua en proporción 70/30 vol/vol en un frasco color ámbar herméticamente sellado.
4. Se cubrió el frasco con papel aluminio y se dejó en un lugar lejos de la luz durante 3 semanas.
5. Mediante decantación se separó la parte líquida.
6. Se filtró la solución empleando papel filtro Whatman grado 40.
7. Se filtró con una jeringa con un filtro Acrodisc de 200 nm acoplado.

### Protocolo de síntesis de nanopartículas

1. Se preparó una solución de 0.01 M de nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) empleando agua ultra pura ( $18.2\text{M}\Omega$ ) a  $25^\circ\text{C}$ .
2. En un frasco de vidrio transparente de 100 mL se agregaron 4mL de extracto de *Rumex*, 2ml de la solución de  $\text{AgNO}_3$  a 0.1M y 16mL de agua ultrapura.
3. El frasco con la mezcla se colocó en el exterior durante una hora expuesto directamente a la luz del sol.
4. El frasco se rotó sobre su eje cada 15 minutos para recibir una iluminación lo más homogénea posible.
5. Se retiró la mezcla de la iluminación y se colocó por partes iguales en dos tubos Falcon de 15 mL.
6. Se retiraron 0.5 mL de cada tubo para caracterización de nanopartículas.
7. Se sónico las nanopartículas de plata.
8. Se centrifugaron las nanopartículas de plata por 30 minutos a 6,000 rpm.

9. Se retiró sobrenadante y los sólidos precipitados se suspendieron en 10 mL de alcohol.
10. Se sónico el contenido de los tubos por 10 minutos.
11. Se centrifugaron las nanopartículas de plata por 30 minutos a 6,000 rpm.
12. Los sólidos recuperados se dejaron secar por 24 horas en un desecador conectado a una bomba de vacío.
13. Los polvos se pesaron y se suspendieron en 1mL de agua ultrapura para su uso en las pruebas.

### **Protocolo de aplicación de tratamientos *in vitro* a *Vibrio parahaemolyticus***

1. Se depositó 50 µl de medio Mueller Hinton Broth en un pocillo de una placa de 96 pozos.
2. Se depositó 30 µl de tratamiento.
3. Se depositó 20 µl de inóculo de bacteria de *Vibrio parahaemolyticus*.
4. Se colocó en un equipo lectora de placas SYNERGYHTX con temperatura controlada de 30 °C.
5. Se configuro la lectora de placas para realizar lecturas a una longitud de onda de 540 cada 15 minutos durante 24 horas, realizando en el equipo una agitación linear de 5 segundos previo a lectura.
6. Se obtuvieron 97 lecturas de datos después de 24 horas y se graficaron con software OriginPro 8.6.

### **Protocolo toxicidad en *Artemia franciscana***

1. Se colocó a eclosionar 0.1 g de quiste de *Artemia franciscana* en un volumen de 100 ml con agua de mar 35 ppt previamente esterilizada y filtrada.
2. Se coloca aireación con una bomba adaptada con una jeringa.
3. Se dejó eclosionando bajo luz blanca y una temperatura de 29 °C por 24 horas.
4. Se recolectó 1 ml por triplicado para tener una media de organismos eclosionados por mL.
5. Se dejó durante 12 horas hasta alcanzar el estadio adecuado.

6. Se depositaron en promedio 25 artemias por placa petri en un volumen de 6mL en placas de 6 pozos con concentraciones de 44 y 50  $\mu\text{g/ml}$  de nanopartículas de plata, 220 y 240  $\mu\text{g/ml}$  de extracto de *Rumex hymenosepalus*.
7. Se dejó durante 24 horas en una incubadora con temperatura controlada a 29°C con exposición a luz blanca.
8. Se contabilizo la sobrevivencia de artemia cada 6 horas.
9. Se procesaron los datos utilizando OriginPro 8.6
10. Cada experimento se realizó por triplicado.

#### **Protocolo de administración de tratamientos a camarones.**

1. Los organismos llegaron en postlarva 15 aclimataron por 5 días en instalaciones del DICTUS.
2. Se preparó la eclosión de artemia 48 horas antes de iniciado el experimento.
3. Se alimentaron artemias durante 18 horas con los tratamientos previos a usarlas como alimento del camarón.
4. Se calcularon 50 artemias por camarón.
5. Se colocaron las postlarvas de camarón en vasos de precipitado de 500 mL con un volumen de agua de mar 35 ppt esterilizada previamente.
6. Se administraron las artemias con el tratamiento a las postlarvas de camarón.
7. 4 horas alimentándose de las artemias, las postlarvas de camarón se trasladaron a matraces con un volumen de 300 mL conectados a un sistema de aireación.
8. Se administró una concentración bacteria para que quedara  $10^5$  cel/mL, de la bacteria *Vibrio parahaemolyticus* en cada matraz.
9. Se realizó cada tratamiento por triplicado, teniendo un total de 18 matraces.
10. Se contabilizó la sobrevivencia de la postarva del camarón cada 6 horas durante 24 horas.
11. Finalizado el experimento se recolectaron postlarvas de camarón fijados en solución de gluteraldehído al 4% para ser observados por microscopia electrónica de transmisión.
12. Se realizaron análisis estadístico mediante el software OriginPro 8.6

## Protocolo de preparación de tejido para TEM (Schrand *et al.*, 2010)

1. Se colocaron los camarones sobre una placa petri, se realizaron cortes y fueron retirados hepatopáncreas e intestino para ser colocados en tubos eppendorf de 2.0 ml con PBS (Phosphate-buffered saline).
2. Se realizaron 2 lavados de PBS de 15 minutos cada uno a cada muestra.
3. Se retiró el PBS y se agregó una solución de tetraóxido de osmio ( $O_3O_4$ ) al 1% durante una hora.
4. Se retiró solución de osmio y se realizaron 2 lavados de 15 minutos con PBS para retirar el exceso de la solución de osmio
5. Se retiró PSB y se realizó una serie de lavados con etanol con concentraciones de 25,50,75,95,100 y 100%\* por 15 minutos cada uno.
6. Se recogieron 20  $\mu$ l de muestra para colocarse sobre una rejilla de cobre de 3 mm de diámetro recubierta de carbono y se dejó secar 2 horas observarse en MEB.
7. Se retiró el alcohol y se realizaron 2 lavados de 15 minutos con óxido de propileno.
8. Se retiró el óxido de propileno, y se depositó durante una hora una mezcla 50:50 de óxido de propileno con resina LX-112.
9. Se retiró la mezcla 50:50, y se agregó resina LX-112.
10. Se transfirió la muestra a capsulas beem donde se agregó resina LX-112 con un DMP-30 como catalizador.
11. Se metió a un horno a 60 °C por 48 horas
12. Se extraen y rompen las capsulas beem con la resina sólida.
13. Se llevó el beem de resina a un Ultramicrotomo.
14. Se empezó realizando cortes de un grosor de 1.2 micras de la muestra, al llegar a 80nm de grosor se coloca sobre una rejilla de cobre recubierta de carbono de 3 mm de diámetro.

\*Nota: Considerando de base alcohol al 96% como 100%

### Protocolo preparación para 15mL de resina LX-112

<b>DDSA (Anhídrido dodecenil succínico)</b>	<b>2.4 g</b>
<b>NMA (Anhídrico methilo nadic)</b>	<b>4.5 g</b>
<b>LX-112</b>	<b>8.1 g</b>
<b>DMP-30</b>	<b>0.14 mL</b>
<b>Tris(dimethylaminomethyl)phenol</b>	